

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. E. Märtlbauer

**Produktion von poly- und monoklonalen Antikörpern
gegen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* und Sporen von *Bacillus cereus*
zur Entwicklung eines bioaffinitätschromatographischen Schnellnachweises**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Fabian Mathias Moritz Wiescher
aus Dachau

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Erwin Märtlbauer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger

Tag der Promotion:

09. Februar 2013

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	<i>Bacillus cereus</i>	3
2.1.1	Historischer Überblick	3
2.1.2	Taxonomische Stellung	4
2.1.3	Pathogene Bedeutung	4
2.1.4	Nachweisverfahren	6
2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.2.1	Historischer Überblick	8
2.2.2	Taxonomische Stellung	9
2.2.3	Pathogene Bedeutung	9
2.2.4	Nachweisverfahren	11
2.3	Antikörper gegen <i>B. cereus</i>	13
2.4	Antikörper gegen <i>S. aureus</i>	16
2.5	Bioaffinitätschromatographie und andere Biosensorsysteme	18
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	22
3.1	Materialien und Geräte	22
3.1.1	Chemikalien	22
3.1.2	Lösungen und Puffer	23
3.1.3	Nährmedien	26
3.1.4	Immunoreagenzien	27
3.1.5	Geräte	27
3.1.6	Sonstige Materialien	28

3.2	Methodik	29
3.2.1	Enzymimmuntests (EIA)	29
3.2.1.1	Indirekte Verfahren	29
3.2.1.2	Sandwich-Verfahren	30
3.2.2	SDS-PAGE und Coomassie-Proteinfärbung	30
3.2.3	Western-/Immunoblot	31
3.2.4	Immunfluoreszenz	31
3.2.5	Generierung und Selektion von Hybridomzelllinien	32
3.3	Ergebnisse	33
3.3.1	Produktion der Immunogene	33
3.3.1.1	Verwendete Stämme	33
3.3.1.2	Anzuchtbedingungen	33
3.3.1.2.1	<i>Bacillus cereus</i>	33
3.3.1.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	35
3.3.1.3	Inaktivierungsverfahren	35
3.3.1.3.1	Verwendung von Paraformaldehyd	35
3.3.1.3.2	Lysostaphin-Auflschluss	36
3.3.1.4	Charakteristika der hergestellten Immunogen-Präparationen	38
3.3.1.4.1	Inaktivierte Keim-Präparationen	38
3.3.1.4.2	<i>S. aureus</i> Protein-Präparationen	40
3.3.2	Herstellung von Antigen-Präparationen	41
3.3.2.1	<i>B. cereus</i> Präparationen	41
3.3.2.2	<i>S. aureus</i> Protein-Präparationen	42
3.3.2.3	Inaktivierung von Protein-A	43
3.3.3	Immunisierung	44
3.3.4	Überprüfung des Immunisierungserfolgs	47
3.3.4.1	Polyklonale Mäuse-Antiseren	47
3.3.4.2	Polyklonale Kaninchen-Antiseren	51

3.3.5	Charakterisierung der Antikörper und Etablierung von Nachweisverfahren	52
3.3.5.1	Monoklonale Antikörper gegen vegetative Formen von <i>B. cereus</i>	53
3.3.5.1.1	Apparente Affinität	54
3.3.5.1.2	Intra- und Intergenusspezifität	55
3.3.5.1.3	Immunoblot	57
3.3.5.2	Antikörper gegen <i>B. cereus</i> Sporen	58
3.3.5.2.1	Sensitivität	58
3.3.5.2.1.1	Apparente Affinität der monoklonalen Antikörper	58
3.3.5.2.1.2	Sandwich-EIA mit polyklonalen Antikörpern und Referenzstämmen	59
3.3.5.2.2	Charakterisierung	61
3.3.5.2.2.1	Intra- und Intergenusspezifität	62
3.3.5.2.2.2	Immunfluoreszenz	65
3.3.5.3	Antikörper gegen <i>S. aureus</i>	67
3.3.5.3.1	Sensitivität	68
3.3.5.3.1.1	Apparente Affinität der monoklonalen Antikörper	68
3.3.5.3.1.2	Sandwich-EIA basierend auf polyklonalem Kaninchenserum	68
3.3.5.3.1.3	Kombinations-Sandwich-EIA mit poly- und monoklonalen Antikörpern	72
3.3.5.3.2	Charakterisierung	73
3.3.5.3.2.1	Intra- und Intergenusspezifität	73
3.3.5.3.2.2	Agglutinationsreaktion	76
3.3.5.3.2.3	Immunfluoreszenz	79

3.3.6	Einsatz der Antikörper in monolithischen Bioaffinitäts- anreicherungsäulen	80
3.3.6.1	Versuchsaufbau und Ablauf	80
3.3.6.2	Anreicherung von <i>B. cereus</i> Sporen aus Magermilch	81
3.3.6.3	Anreicherung von <i>S. aureus</i>	84
3.3.6.4	Überprüfung Sepharose-basierter Bioaffinitäts- anreicherungsäulen für <i>S. aureus</i>	85
4	DISKUSSION	88
4.1	Generierung von Antikörpern	89
4.2	Nachweissysteme	95
4.3	Bioaffinitätsanreicherung	97
5	ZUSAMMENFASSUNG	99
	SUMMARY	100
6	LITERATURVERZEICHNIS	101
7	ANHANG	130
8	DANKSAGUNG	139

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	SDS-PAGE von proteinhaltigen Überständen, die nach Lysostaphin-Auflschluss verschiedener Staphylokokken-Isolate gewonnen wurden.	37
Abbildung 2	Reaktivität von unbehandeltem und inaktiviertem Protein-A (75 ng/ml) mit irrelevanten und spezifischen Antikörpern im indirekten EIA.	44
Abbildung 3	Nachweisbare Antikörper-Titer in den Antiseren der mit <i>S. aureus</i> Lysostaphin-ÜS immunisierten Mäuse bzw. der mit vegetativen Formen von <i>B. cereus</i> immunisierten Tiere.	48
Abbildung 4	Überprüfung von mit unterschiedlichen Immunogenen hergestellten Mäuseseren gegen <i>S. aureus</i> mittels Immunoblot.	51
Abbildung 5	Nachweisbare Antikörper-Titer in den Antiseren der mit <i>S. aureus</i> immunisierten Kaninchen (#71 & #75) bzw. des mit Sporen von <i>B. cereus</i> immunisierten Tieres (#74).	52
Abbildung 6	Standardkurven der mAk gegen vegetative Formen der Referenzstämme von <i>B. cereus</i> im indirekten EIA.	55
Abbildung 7	Reaktivität der mAk gegen vegetative Formen von <i>B. cereus</i> .	56
Abbildung 8	Westernblot-Analysen zur Reaktivität der mAk mit Oberflächenproteinen des <i>B. cereus</i> -Referenzstammes DSM 31.	57
Abbildung 9	Standardkurven der indirekten EIAs zum Nachweis von lebenden <i>B. cereus</i> Sporen unter Verwendung der mAk 1F12 bzw. 2E7.	59
Abbildung 10	Standardkurven der auf Kaninchenserum basierenden Sandwich-EIAs zum Nachweis von Sporen des <i>B. cereus</i> Stammes DSM 4312 unter Verwendung verschiedener Substrate und Detektionsantikörper.	61
Abbildung 11	Reaktivität der mAk 1F12 und 2E7 gegenüber der <i>Bacillus</i> Sporen-Stammbibliothek in indirekten EIAs.	62
Abbildung 12	Prozentuale Verteilung der Nachweisgrenzen (NWG) für Sporenpräparationen von Keimen des Genus <i>Bacillus</i> im auf Kaninchenserum basierenden Sandwich-EIA.	63

Abbildung 13	Vergleichende Darstellung der im Sandwich-EIA erhaltenen Standardkurven für Sporen bzw. vegetative Formen von zwei <i>B. cereus</i> Referenzstämmen.	65
Abbildung 14	Sporen von <i>B. cereus</i> Stamm DSM 4312 im Phasenkontrast und in der Immunfluoreszenz, markiert mit Kaninchenserum des Tieres #74 (17. Abnahmewoche).	66
Abbildung 15	Reaktivität des mAk 1F12 mit einer Oberflächen-Proteinpräparation von Sporen des <i>B. cereus</i> -Stammes MHI M1 im Immunoblot.	66
Abbildung 16	Antigen-Titerkurven der mAk 2D12, 2H1 und 2B2 im indirekten EIA.	68
Abbildung 17	Merkmale der Staphylokokken in der Stammbibliothek im Bezug auf Protein-A Expression.	70
Abbildung 18	Effekt der Vorbehandlung von <i>S. aureus</i> Keimen mit unspezifischen Seren zur Absättigung von Protein-A auf deren Reaktivität im EIA.	70
Abbildung 19	Staphylokokken im Phasenkontrast und in der Immunfluoreszenz.	71
Abbildung 20	Standardkurven des Kaninchenserum-Sandwich-EIA zum Nachweis des Protein-A positiven <i>S. aureus</i> Referenzstammes DSM 20372.	72
Abbildung 21	Standardkurve des Kombinations-Sandwich-EIA zum Nachweis von <i>S. aureus</i> (DSM 20491 Ribolysat) bei Verwendung des mAk 2C2.	73
Abbildung 22	Durchschnittliche Nachweisgrenzen (NWG) des Sandwich-EIA zum Nachweis von Staphylokokken in Abhängigkeit von der Expression von Koagulase bzw. Protein-A.	75
Abbildung 23	Reaktivität der mAk 1E9 und 2C2 gegenüber den mit Kaninchenserum abgesättigten <i>S. aureus</i> -Keimpräparationen aus der Stammbibliothek im Sandwich-EIA.	76
Abbildung 24	<i>S. aureus</i> MHI 304 im Agglutinationstest.	77
Abbildung 25	<i>S. aureus</i> Stamm DSM 20491 (Protein-A negativ) im Phasenkontrast und in der Immunfluoreszenz.	79
Abbildung 26	Immunoblots von mAk gegen <i>S. aureus</i> .	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Zur Herstellung der Immunogene eingesetzte <i>B. cereus</i> bzw. <i>S. aureus</i> Stämme.	33
Tabelle 2	Kenndaten zu den als Immunogen verwendeten <i>B. cereus</i> Sporen-Präparationen.	38
Tabelle 3	Kenndaten zu den als Immunogen verwendeten Präparationen von vegetativen <i>B. cereus</i> .	39
Tabelle 4	Kenndaten zu den als Immunogen verwendeten <i>S. aureus</i> PFA-Präparationen.	39
Tabelle 5	Kenndaten zu den als Immunogen verwendeten <i>S. aureus</i> Lysostaphin-Präparationen.	40
Tabelle 6	Verwendete Beschichtungsantigene zur Durchführung der indirekten Enzymimmuntests zum Nachweis von <i>B. cereus</i> bzw. <i>S. aureus</i> .	41
Tabelle 7	Übersicht zur Immunisierung von Mäusen mit <i>B. cereus</i> Sporen bzw. vegetativen Formen.	45
Tabelle 8	Übersicht zur Immunisierung von Mäusen mit Paraformaldehyd-inaktivierten <i>S. aureus</i> Keimen bzw. <i>S. aureus</i> Protein-Präparationen.	46
Tabelle 9	Gewinnung von polyklonalen Kaninchen-Antiseren gegen <i>S. aureus</i> und <i>B. cereus</i> Sporen.	47
Tabelle 10	Reaktivität der polyklonalen Mäuseseren gegen <i>B. cereus</i> und <i>S. aureus</i> in ausgewählten EIA-Systemen.	50
Tabelle 11	Herstellung monoklonaler Antikörper zum Nachweis von <i>S. aureus</i> und <i>B. cereus</i> : Übersicht über durchgeführte Zellfusionsexperimente, reaktive Klone und etablierte Zelllinien.	53
Tabelle 12	Monoklonale Antikörper gegen vegetative Formen von <i>B. cereus</i> .	54
Tabelle 13	Durchschnittliche Nachweisbarkeit von Sporen der untersuchten Bazillenstämme in den optimierten EIA-Verfahren.	64
Tabelle 14	Übersicht zu den etablierten mAk zum Nachweis von <i>S. aureus</i> .	67
Tabelle 15	Reaktivität von Staphylokokken-Stämmen im Kaninchenserum-Sandwich-EIA.	74
Tabelle 16	Ergebnisse der Agglutinationsreaktionen für verschiedene Staphylokokken-Stämme bei Verwendung der polyklonalen Kaninchen-Antiseren.	78

Tabelle 17	Überblick über die Sporenanreicherungsversuche (n = 3) aus 100 ml Magermilchproben mit monolithischen Säulen.	81
Tabelle 18	Mittels real-time PCR bzw. Plate Count-Verfahren nachgewiesene Keimgehalte in den bei der Bioaffinitätsanreicherung erhaltenen Eluat.	83
Tabelle 19	Übersicht über Versuche mit Sepharose-basierten Bioaffinitätsanreicherungssäulen.	87
Tabelle A1	Zusammensetzung der Stammbibliothek für vegetative Formen von <i>B. cereus</i> , sowie deren Reaktivität mit den generierten mAk im indirekten EIA.	130
Tabelle A2	Zusammensetzung der Stammbibliothek für vegetative Formen der Stämme der <i>Cereus</i> -Gruppe, sowie deren Reaktivität mit den generierten mAk im indirekten EIA.	132
Tabelle A3	Zusammensetzung der Stammbibliothek für vegetative Formen der Stämme der anderen Bazillen, sowie deren Reaktivität mit den generierten mAk im indirekten EIA.	132
Tabelle A4	Zusammensetzung der Stammbibliothek für Sporen von <i>B. cereus</i> , sowie deren Reaktivität mit den generierten Antikörpern.	133
Tabelle A5	Zusammensetzung der Stammbibliothek für Sporen der <i>Cereus</i> -Gruppe, sowie deren Reaktivität mit den generierten Antikörpern.	135
Tabelle A6	Zusammensetzung der Stammbibliothek für Sporen anderer Bazillen, sowie deren Reaktivität mit den generierten Antikörpern.	135
Tabelle A7	Zusammensetzung der Stammbibliothek für koagulasepositive Staphylokokken, sowie deren Reaktivität mit den generierten Antikörpern.	136
Tabelle A8	Zusammensetzung der Stammbibliothek für koagulasenegative Staphylokokken, sowie deren Reaktivität mit den generierten Antikörpern.	138

Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	aqua destillata
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
B.	<i>Bacillus</i>
BSA	bovines Serumalbumin
Ct	Fluoreszenzschwelle (cycle threshold)
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmuntest (enzyme immunoassay)
ELISA	Enzymimmuntest (enzyme linked immunosorbent assay)
FA	Freundsches Adjuvans
Fc	kristallisierbares Fragment (fragment crystalline)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Erdbeschleunigung
g/v	Massenkonzentration
HAT-Medium	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium
HRP	Meerrettich Peroxidase (horse radish peroxidase)
HSA	humanes Serumalbumin
IgG	Immunglobulin G
Ig-HRP	Immunglobulin-HRP Konjugat
IgM	Immunglobulin M
i.p.	intraperitoneal
KbE	koloniebildende Einheiten
kDa	Kilodalton
KNS	koagulasenegative Staphylokokken
KPS	koagulasenegative Staphylokokken
<i>Lnn. axillares</i>	<i>Lymphonodi axillares</i>
MAk/mAk	monoklonale(r) Antikörper

MHI	Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch
MPN	wahrscheinlichste Nummer (most probable number)
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NWG	Nachweisgrenze
PAk/pAk	polyklonale(r) Antikörper
past.	pasteurisiert
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEMBA	Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannitol-Bromthymolblau-Agarplatte
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
S.	<i>Staphylococcus</i>
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
SE	Staphylokokken-Enterotoxin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline)
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TSB	Trypton Soja Bouillon
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜS	Überstand
v/v	Volumenkonzentration
ZKÜ	Zellkulturüberstand

1 Einleitung

Die beiden human- und tierpathogenen Bakterienspezies *Bacillus cereus* und *Staphylococcus aureus* sind schon lange aufgrund ihrer Toxinproduktion im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen bekannt (BECKER et al., 2007; STENFORS ARNESEN et al., 2008; SCHELIN et al., 2011; LOGAN, 2012). Beide Keime sind zudem in der Lage, extragastrointestinale Erkrankungen verschiedenen Schweregrades hervorzurufen (DROBNIOWSKI, 1993; BOTTONE, 2010; DELEO et al., 2010; KÖCK et al., 2010).

S. aureus besiedelt die Schleimhäute des oberen Respirationstraktes, der Mensch selbst stellt ein wesentliches Reservoir dar (WERTHEIM et al., 2005; GORWITZ et al., 2008) und kann so eine Eintragsquelle in Lebensmittel darstellen. *B. cereus* ist ubiquitär und besitzt die Fähigkeit, extrem resistente Sporen zu bilden, die nur sehr schwer von Oberflächen und aus Gerätschaften zu entfernen sind. Dadurch gestaltet es sich als besonders schwierig, den Keim nicht in die Produktionskette gelangen zu lassen (NICHOLSON et al., 2000; PIRTTIJÄRVI et al., 2000). Über die Gefahr eines Krankheitsausbruches beim Verbraucher hinaus spielt *B. cereus* aufgrund seiner proteolytischen Aktivität eine große Rolle als Verderbserreger, und führt zu geringerer Haltbarkeit von Produkten (ANDERSSON et al., 1995; DE JONGHE et al., 2010).

Im Bezug auf Lebensmittelvergiftungen sind beide Keime in der Lage, durch ihre Toxine Erbrechen und Durchfall auszulösen (BALABAN & RASOOLY, 2000; THOMAS et al., 2007; SENESI & GHELARDI, 2010; LOGAN, 2012). Die Problematik wird durch das häufige Vorkommen in Lebensmitteln noch verschärft: In Untersuchungen von NYGREN (1962) und BECKER et al. (1994) wurde *B. cereus* in der Hälfte der untersuchten Lebensmittelproben gefunden; SCALLAN et al. (2011) schätzten die jährliche Zahl der Erkrankungen durch Toxine von *S. aureus* in den USA auf 241.148 Fälle.

Die in den offiziellen DIN-Normen für *B. cereus* und *S. aureus* beschriebenen Nachweisverfahren beinhalten alle einen zeitaufwändigen Anreicherungsschritt, der dazu dient, die Bakterienkonzentration so weit zu erhöhen, dass ein sicherer Nachweis der Keime auf dem jeweiligen Selektivnährboden möglich ist.

Die Bioaffinitätschromatographie ermöglicht es hingegen, gewünschte Analyten, u.a. auch Bakterien, die in einer Probe vorhanden sind, sofort und ohne einen Wachstumsschritt zu konzentrieren (HAGE, 1999). Dabei sind unter den verschiedenen möglichen Materialien für Chromatographiesäulen die Monolithen von besonderem Interesse, da sie sehr flexibel einsetzbar und sehr druckstabil sind, was einen Durchsatz von hohen Probenvolumina und

somit eine starke Konzentrierung der Zielanalyten zulässt (PESKOLLER et al., 2009; TETALA & VAN BEEK, 2010; OTT et al., 2011).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Herstellung von spezifischen polyklonalen (pAk) und monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen *B. cereus*, Sporen von *B. cereus* und *S. aureus* die Grundlage für die Etablierung von bioaffinitätschromatographischen Konzentrierungsverfahren für diese lebensmittelhygienisch wichtigen Keime zu schaffen. Dazu sollten verschiedene Immunogen-Präparationen hergestellt und die generierten polyklonalen Antiseren bzw. monoklonalen Antikörper anhand von umfangreichen Stammbibliotheken umfassend charakterisiert werden. Zudem sollten spezifische immunchemische Nachweisverfahren (indirekte Verfahren und Sandwich-EIA) etabliert werden, sowie die Einsetzbarkeit vielversprechender Antikörper zur bioaffinitätschromatographischen Anreicherung von Mikroorganismen aus Magermilch überprüft werden.

Diese Arbeit wurde im Programm zur Förderung der „Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF)“ unter der Projektnummer AiF 331 ZN vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert.

Die im Rahmen dieser Arbeit am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch durchgeführten Eingriffe und Behandlungen an Tieren wurden der Regierung von Oberbayern gemäß §10a des Tierschutzgesetzes mit dem Vorhaben „Herstellung monoklonaler Antikörper gegen lebensmittelhygienisch relevante Substanzen“ angezeigt und unter dem Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531.6-1-08 am 24. Januar 2008 genehmigt.

2 **Schrifttum**

2.1 *Bacillus cereus*

2.1.1 **Historischer Überblick**

Das Genus *Bacillus* wurde von COHN (1872) benannt, der damit auf die Form der Bakterien anspielte (lat. bacillus: Stäbchen). *Bacillus (B.) cereus* wurde zum ersten Mal von FRANKLAND & FRANKLAND (1887) erwähnt, die den Keim aus einer Luftsammelprobe eines Kuhstalls isoliert hatten. Die Namensgebung basierte auf der Morphologie der Bakterienkolonien (lat. cereus: wächsern, wachsfarben) auf festen Nährmedien. Bereits in dieser ersten Beschreibung wurden viele charakteristische Eigenschaften des Keimes (Morphologie, Motilität, Sporenbildung, Verflüssigung von festen Gelatinemedien) beobachtet.

Erste Vermutungen über pathogene Eigenschaften eines Bakteriums („*Bacillus peptonificans*“), bei dem es sich aufgrund der Beschreibung retrospektiv mit großer Wahrscheinlichkeit um *B. cereus* handelte, stammen von LUBENAU (1906). Dieser beschrieb und untersuchte Gastroenteritiserkrankungen in einer Lungenheilstätte und führte sie auf den Verzehr von Königsberger Klopsen, aus denen das Bakterium isoliert wurde, zurück. In der Mitte des letzten Jahrhunderts wurde immer häufiger postuliert, dass aerobe Sporenbildner ursächlich bei der Entstehung lebensmittelassoziierter Magen-Darm-Erkrankungen beteiligt sind (NIKODEMUSZ et al., 1962). In Tierversuchen mit Hunden und Katzen (NIKODEMUSZ, 1965; NIKODEMUSZ & GONDA, 1966; NIKODEMUSZ, 1967), aber auch in Fallstudien und sogar Selbstversuchen (HAUGE, 1950, 1955) konnte schließlich der kausale Zusammenhang zwischen *B. cereus* und gastrointestinalen Erkrankungen nachgewiesen werden.

Inzwischen ist *B. cereus* auch als Erreger von extraintestinalen Erkrankungen, z.B. Wundinfektionen, Septikämie, Endokarditis, Infektion des zentralen Nervensystems, des Auges und der Lunge – des öfteren auch in Zusammenhang mit Drogenmissbrauch – bekannt (DROBNIIEWSKI, 1993; DANCER et al., 2002; MCLAUCHLIN et al., 2002).

2.1.2 Taxonomische Stellung

Das Genus *Bacillus* umfasst derzeit nach EUZÉBY (2012) 259 Spezies und 7 Subspezies (Stand: 16.07.2012). Bei *B. cereus* handelt es sich um fakultativ anaerobe, grampositive, in der Regel bewegliche, sporenbildende Stäbchen. Aus praktischen Erwägungen werden nach der Größe der Bakterien, ihrer Form, der Lage der Spore und den im Zusammenhang mit der Versporung im Sporangium auftretenden Fettkörperchen die morphologischen Gruppen 1A, 1B, 2 und 3 unterschieden (SMITH et al., 1952; GIBSON & GORDON, 1974), wobei *B. cereus* zusammen mit *B. megaterium* und den weiteren Mitgliedern der Cereus-Gruppe (*B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis* und *B. thuringiensis*) zur morphologischen Gruppe 1A gehört. Details zur Differenzierung innerhalb der Cereus-Gruppe finden sich bei GRANUM (2007).

2.1.3 Pathogene Bedeutung

B. cereus ist in Böden und in der Umwelt allgemein verbreitet (GRANUM, 2007) und durch die Sporenbildung weitgehend resistent gegenüber Hitze, Trockenheit, Strahlung und anderen Stressfaktoren (NICHOLSON et al., 2000). Er kann daher über viele Wege in die Lebensmittelkette eingetragen werden, z.B. auch über Verpackungsmaterial wie Papier und Kartonagen (PIRTTIJÄRVI et al., 2000).

Die Häufigkeit des Vorkommens von *B. cereus* in Lebensmitteln geht aus einer Reihe von Studien hervor. So wurde der Keim von NYGREN (1962) in 1860 von 3888 Lebensmittelproben (47,8 %), die aus den Routineuntersuchungen der schwedischen Milchwirtschaft stammten, gefunden. BECKER et al. (1994) isolierten *B. cereus* aus 141 von 261 Proben (54 %) von Säuglings- und Kleinkindernahrung aus dem europäischen Raum. Der Erreger wurde inzwischen als Prozesshygienekriterium für „getrocknete Säuglingsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind“ in die Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel aufgenommen (VO (EG) NR. 1441/2007). Auch in Reis aus dem US-amerikanischen Einzelhandel wurde *B. cereus* nachgewiesen: ANKOLEKAR et al. (2009) fanden die Keime in 83 von 178 Proben (46,6 %). Ebenfalls in den USA wurde *B. cereus* von RAHMATI & LABBE (2008) aus Fischen und Meeresfrüchten

isoliert, wobei 62 von 347 Proben (17,9 %) positiv waren. In Honig aus Argentinien fanden LÓPEZ & ALIPPI (2007) die Bakterien in 114 von 433 Proben (26,3 %).

Zwei Klassen von *B. cereus* Toxinen, die lebensmittelassoziierte Krankheiten auslösen können, werden unterschieden: Ein emetisches Toxin, das Erbrechen hervorruft (Cereulid; AGATA et al., 1994), und die drei Enterotoxine Hämolysin BL (Hbl), Nicht-hämolisierendes Enterotoxin (Nhe) und Zytotoxin K (CytK), die Durchfall auslösen (STENFORS ARNESEN et al., 2008; SENESI & GHELARDI, 2010). Neben diesen toxinbedingten gastrointestinalen Erkrankungen kann, wie oben bereits erwähnt, *B. cereus* auch extraintestinale Erkrankungen hervorrufen (DROBNIEWSKI, 1993; BOTTONE, 2010). Beschrieben wurden u.a. nosokomiale Infektionen (PILLAI et al., 2006; DOHMAE et al., 2008; KUROIKI et al., 2009), Septikämien (LEDE et al., 2011; HIRABAYASHI et al., 2012), Endophthalmitiden (ALTIPARMAK et al., 2007; CALLEGAN et al., 2011), Pneumonien (HOFFMASTER et al., 2006; KATSUYA et al., 2009; FORSBERG et al., 2011), Infektionen des zentralen Nervensystems (LEQUIN et al., 2005; ICHIKAWA et al., 2010), gangränöse Infektionen (GROSCHERL et al., 1976; SADA et al., 2009), Hautinfektionen (HENRICKSON et al., 1989; CDC, 2005), Endokarditiden (STEEN et al., 1992; CASTEDO et al., 1999; CONE et al., 2005), Osteomyelitiden (SCHRICKER et al., 1994), Harnwegsinfektionen (SATO et al., 1998) und Arthritiden (ROBINSON, 1979; CUCHACOVICH et al., 2002).

In Deutschland sind Erkrankungen durch *B. cereus* nicht meldepflichtig, und werden daher beim Robert Koch Institut nicht erfasst. Gemäß der Allgemeinen Verwaltungsvorschrift (AVV) Zoonosen Lebensmittelkette sollen zwar Daten über die an lebensmittelbedingten Ausbrüchen beteiligten Erreger von den zuständigen Stellen der Bundesländer dem Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) übermittelt werden, doch vermerkt das BfR selbst in seinem Bericht über „Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2009“ (HARTUNG & KÄSBOHRER, 2011) eine unterschiedliche Meldebereitschaft der einzelnen Länder. Die Angaben zur Zahl der Ausbrüche – fünf gemeldete lebensmittelbedingte Ausbrüche durch *B. cereus* im Jahr 2009, davon einer unbestätigt (HARTUNG & KÄSBOHRER, 2011) – machen daher keinen zuverlässigen Eindruck. Auch die auf Meldungen der europäischen Länder bei der European Food Safety Authority (EFSA) beruhenden Daten erscheinen wenig realistisch. So lag die Zahl der 2010 von insgesamt neun Ländern gemeldeten, durch *Bacillus* spp. bedingten Ausbrüche mit hoher epidemiologischer Sicherheit („strong evidence outbreaks“) bei 26 mit insgesamt 561 Erkrankungsfällen, davon allein 314 in Ungarn, aber nur drei in Deutschland (EFSA, 2012). Nach einer 2011 in den USA erschienenen Studie (SCALLAN et al., 2011), deren Ergebnisse auf einer breiten, statistisch gut abgesicherten

Datenbasis beruhen, liegt die Zahl der jährlich dort durch *B. cereus* in Lebensmitteln hervorgerufenen Erkrankungsfälle bei 63.000 (mit einem 90 % Vertrauensbereich von 15.719-147.354). Vergleicht man diesen Wert mit dem der neun EU-Staaten (561 Fälle), insbesondere unter Berücksichtigung der nahezu gleich großen Einwohnerzahl (USA: ca. 312. Mill., die neun EU-Staaten ca. 303 Mill.), so erscheint die EFSA-Statistik wenig vertrauenswürdig.

In der Tiermedizin ist besonders die gangränöse Mastitis des Rindes als durch *B. cereus* verursachte Krankheit aufgrund des oft dramatischen Verlaufs und der großen Gewebeschäden gefürchtet (SCHIEFER et al., 1976; PARKINSON et al., 1999). Ebenfalls wurden Fälle beschrieben, in denen *B. cereus* mit Aborten bei Rindern (SCHUH & WEINSTOCK, 1985), Pferden (RANGANATHA et al., 1981) und Kamelen (WERNERY et al., 1996) in Verbindung gebracht wurde. Trotz der beschriebenen human- und tierpathogenen Eigenschaften werden als probiotisch geltende Stämme Lebens- bzw. Futtermitteln zugesetzt (HONG et al., 2005).

Aufgrund der hohen Resistenz der Sporen und besonderen Stoffwechseleigenschaften der vegetativen Formen ist das pathogene Potential von *B. cereus* nicht das einzige Problem für den Lebensmittelsektor, das von diesem Keim ausgeht. In Milch und anderen proteinreichen Produkten verursacht die proteolytische Aktivität der Bakterien bitteren Geschmack, verringerte Haltbarkeit, Süßgerinnung (Gerinnung ohne pH-Wert-Absenkung) und schnelleren Verderb (ANDERSSON et al., 1995). Durch seine Lecithinaseaktivität ist *B. cereus* Verursacher der sogenannten „bitty“ oder „broken cream“, einem Fehler, der vor allem bei Kaffeesahne eine Rolle spielen kann (DE JONGHE et al., 2010).

2.1.4 Nachweisverfahren

Der Nachweis von *B. cereus* erfolgt in der Regel kulturell. Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von *B. cereus* (YAMADA et al., 1999) oder zur Differenzierung der Cereus-Gruppe (CHANG et al., 2003) haben sich bisher nicht durchgesetzt.

Auf Blutagar lassen sich die meisten *B. cereus*-Kolonien aufgrund ihrer Morphologie und Hämolyseaktivität gut identifizieren (HAUGE, 1955). Der Hämolysetest ist daher auch als Bestätigungstest bei den weiter unten genannten standardisierten DIN EN ISO Referenzverfahren vorgesehen. Allerdings soll es schwach oder sogar anhämolysierende *B. cereus* Stämme geben (EHLING-SCHULZ et al., 2004). Für die Erstisolierung des

Erregers aus Lebensmitteln werden normalerweise Selektivmedien eingesetzt. In diesem Zusammenhang haben sich der Mannit-Eigelb-Polymyxin-Agar (MYP; MOSSEL et al. 1967) und der Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannit-Bromthymol-Agar (PEMBA; HOLBROOK & ANDERSON 1980), die als selektive Komponente Polymyxin B enthalten, durchgesetzt. Bei beiden Medien dient Eigelb als Nachweis für eine Lecithinaseaktivität („Eigelbhof“). Mannit, das ebenfalls in beiden Medien enthalten ist, wird von *B. cereus* nicht abgebaut. Infolgedessen kommt es durch die Spaltung der in den Medien als Nährstoffe enthaltenen Eiweißhydrolysate zu einer Alkalisierung und einem Farbumschlag des pH-Wert-Indikators. Daneben wurden in den letzten Jahren auch chromogene Medien entwickelt, die sich aus patentrechtlichen Gründen allerdings nur schwer in genormte Verfahren integrieren lassen (TALLENT et al., 2012).

Momentan existieren drei derartige Normen zum Nachweis von *B. cereus* auf nationaler, europäischer und internationaler Ebene. Rein national ist das Verfahren des Deutschen Instituts für Normung DIN 10198:2010, ein Koloniezählverfahren unter Verwendung von PEMBA zum Nachweis bei 37 °C in Milch und Milcherzeugnissen. Allgemein auf Lebensmittel anwendbar (horizontal) ist DIN EN ISO 7932:2005, ein Koloniezählverfahren bei 30 °C unter Verwendung von MYP, sowie DIN EN ISO 21871:2006, eine Most Probable Number (MPN)-Methode zur statistischen Abschätzung des Keimgehaltes. Hier erfolgt die Anreicherung in einer polymyxinhaltigen Bouillon und der anschließende Nachweis des Erregers auf PEMBA oder MYP. Das Verfahren ist zur Erfassung geringer Keimzahlen geeignet. Der Nachweis dauert bei den Koloniezählverfahren 18-48 Stunden. Bei Verwendung von PEMBA kann die Bestätigung verdächtiger Kolonien wegen der raschen Versporung alternativ zum Hämolysetest auch mit einer spezifischen Färbung (ca. 20 min) vorgenommen werden. Bei Verwendung von MYP erfolgt die Bestätigung mit dem Hämolysetest, der nochmals 24 Stunden dauert. Das MPN-Verfahren verlängert sich wegen der Inkubation des flüssigen Selektivmediums nochmals um 48 Stunden.

Bei allen drei Methoden kann nicht sicher zwischen den einzelnen Mitgliedern der *Cereus*-Gruppe (siehe 2.1.2) differenziert werden. Der Nachweis bezieht sich daher stets auf sogenannte präsumtive *B. cereus*.

2.2 *Staphylococcus aureus*

2.2.1 Historischer Überblick

Der Name *Staphylococcus* (gr. σταφυλή, staphyli: Weintraube; gr. κοκκος, kokkos: Korn, Beere) wurde von Alexander Ogston im Jahre 1880 geprägt, der die traubenähnlichen Wuchsformen der Bakterien in Eiterproben als Grundlage für die Benennung wählte (OGSTON & WITTE, 1984). Die Bezeichnung *Staphylococcus (S.) aureus* stammt von ROSENBACH (1884), der die Bakterien aus menschlichem Eiter isolierte und charakterisierte. Der Name geht auf die Farbe typischer Kolonien auf festen Medien zurück (lat. aureus: goldfarben), die auch nach mehreren Passagen auf verschiedenen Nährböden erhalten blieb. Auch stellte er fest, dass nach parenteraler Applikation dieser Bakterien bei Versuchstieren Abszesse induziert wurden, die wieder mit den traubenförmig wachsenden, goldene Kolonien bildenden Bakterien gefüllt waren. Somit galt *S. aureus* von Anfang an als Eitererreger, Abszessbildner und Auslöser von Wundinfektionen.

LOEB (1903) entdeckte, dass *S. aureus* in der Lage ist, Plasma in einem Röhrchen binnen weniger Stunden zu koagulieren, und entwickelte so den Koagulasetest, der heute standardisiert mit EDTA-stabilisiertem Kaninchenplasma durchgeführt wird. Der ebenfalls heute noch genutzte Nachweis des Clumping Factor A (Klumpungstest) wurde fünf Jahre später von MUCH (1908) beschrieben. Die schwersten Erkrankungen durch Staphylokokken werden mit koagulasepositiven Spezies in Verbindung gebracht.

Die erste Vermutung, dass *S. aureus* ein Toxin bildet, das in der Lage ist, Lebensmittelvergiftungen auszulösen, stammt von BARBER (1914). Milch, in der er Staphylokokken fand, löste die immer gleiche Symptomatik mit Erbrechen, Darmkrämpfen und Durchfall aus. Weitere Anhaltspunkte für ein lösliches Toxin, das als ätiologisches Agens angesehen werden kann, fanden DACK et al. (1930). Freiwilligen Versuchspersonen wurden Kulturüberstände von *S. aureus*-Stämmen verabreicht, die in Kuchen, die Lebensmittelvergiftungen ausgelöst hatten, gefunden worden waren. Die Versuchspersonen entwickelten dieselben Symptome wie die ursprünglich nach dem Verzehr der Kuchen erkrankten Patienten.

1928 entdeckte Alexander Fleming die antibiotische Wirkung von Penicillin in *S. aureus*-Kulturen (FLEMING, 1980). Vor dessen Einführung in die Therapie lag die Letalität von bakteriämischen *S. aureus* Infektionen bei 82 % (SKINNER & KEEFER, 1941). Der Einsatz von Penicillin gegen Infektionen mit Staphylokokken setzte sich schnell durch und führte zur

Selektion penicillinasebildender Keime (KIRBY, 1944), die bald darauf immer häufiger insbesondere in Probenmaterial von Krankenhauspatienten gefunden wurden (BARBER & ROZWADOWSKA-DOWZENKO, 1948). Verschiedene Penicillin-Antibiotika kamen gegen Staphylokokken zum Einsatz, u.a. auch Methicillin, das den Anfang der 60er Jahre auftretenden Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) ihren Namen gab (JEVONS et al., 1961; SUTHERLAND & ROLINSON, 1964). Das Problem der multiplen Antibiotikaresistenz von *S. aureus* hält weiterhin an. In den letzten Jahren sind gleichbleibend 20 % der in Deutschland klinisch isolierten *S. aureus* Stämme resistent gegenüber Penicillinen (KÖCK et al., 2011). Angaben aus anderen Ländern überschreiten diesen Anteil noch bei weitem und liegen beispielhaft bei > 50 % in Nord- und Südamerika, 49 % in Portugal, 37 % in Italien oder sogar bei 86,5 % in Sri Lanka und 77,6 % in Südkorea (STEFANI et al., 2012).

2.2.2 Taxonomische Stellung

Das Genus *Staphylococcus* umfasst derzeit nach EUZÉBY (2012) 47 Spezies und 24 Subspezies (Stand: 16.07.2012). Acht Spezies bzw. Subspezies hiervon sind koagulasepositiv (Einzelheiten siehe bei BECKER et al., 2007). *S. aureus* wurde 1985 von DE LA FUENTE et al. durch die Beschreibung von *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* in zwei Subspezies unterteilt. Im Folgenden wird, entsprechend den Gepflogenheiten des Schrifttums, unter der Bezeichnung *S. aureus* stets die Subspezies *S. aureus* subsp. *aureus* verstanden. Dabei handelt es sich um unbewegliche, grampositive Kokken, die fakultativ anaerob, katalasepositiv, oxidasenegativ sind und keine Sporen bilden (SCHLEIFER & BELL, 2009).

2.2.3 Pathogene Bedeutung

Staphylokokken sind ubiquitär. Auch der Mensch ist durch die Besiedelung seiner Nasenschleimhaut und des oberen Respirationstraktes ein wesentliches Reservoir für *S. aureus* (WERTHEIM et al., 2005; GORWITZ et al., 2008). Infektionen mit dem Erreger stellen insbesondere im Bezug auf die weite Verbreitung von MRSA in Krankenhäusern und Einrichtungen zur Pflege alter und kranker Menschen eine ernstzunehmende Gefahr dar (DELEO et al., 2010; KÖCK et al., 2010; KÖCK et al., 2011; STEFANI et al., 2012). In den

USA starben im Jahr 2005 ca. 19.000 Patienten an MRSA-Infektionen, was diese zu einer der häufigsten Ursachen für Todesfälle in Krankenhäusern macht (BOUCHER & COREY, 2008).

Abgesehen von diesen Infektionen, bei denen auch Exotoxine am Krankheitsverlauf beteiligt sind, spielt *S. aureus* aufgrund seiner Enterotoxinbildung eine wichtige Rolle in der Ätiologie von Lebensmittelintoxikationen (BALABAN & RASOOLY, 2000; THOMAS et al., 2007; SCHELIN et al., 2011). Es sind inzwischen über 20 verschiedene Staphylokokken-Enterotoxine (SE) bekannt (HENNEKINNE et al., 2012). SE sind sehr potente Superantigene, d.h. sie sind in der Lage, eine unspezifische Aktivierung von T-Zellen zu induzieren, was in einer überschießenden, den Organismus gefährdenden Immunantwort resultiert (MARRACK & KAPPLER, 1990). Ob die in den letzten Jahren im Zusammenhang mit der intensiven Superantigenforschung beschriebenen „SE“ wirklich alle auch Enterotoxincharakter haben, ist nicht bewiesen, bzw. ist von einigen bekannt, dass sie nicht in der Lage sind bei Primaten das für eine derartige Intoxikation typische Erbrechen auszulösen. Es wurde daher bereits 2004 durch das International Nomenclature Committee for Staphylococcal Superantigens (INCSS) vorgeschlagen, nur solche Toxine, die im Primatenversuch nach oraler Applikation Erbrechen hervorrufen, als SE zu benennen und andere verwandte Toxine, die diese Eigenschaft nicht besitzen oder noch keinen entsprechenden Versuchen unterzogen wurden, als „staphylococcal enterotoxin-like“ (SEL) Superantigene zu bezeichnen (LINA et al., 2004). Einzelheiten zu Bildung, Eigenschaften und Nachweis der SE wurden von BECKER et al. (2007) zusammengefasst. Eine problematische Eigenschaft der SE ist die hohe Resistenz gegenüber widrigen Umwelteinflüssen, beispielsweise werden sie in Vollmilch erst nach über 10 minütiger Erhitzung auf 121,1 °C inaktiviert (TATINI, 1976). Bei der wesentlich schonenderen küchenmäßigen Bearbeitung von Lebensmitteln ist daher nicht mit einer nennenswerten Inaktivierung zu rechnen. Klassischerweise werden durch die Toxine Erbrechen und Durchfall, aber auch Unwohlsein, Schweißausbrüche, Schwindelgefühl, Kopfschmerzen, Leibschmerzen und Muskelkrämpfe ausgelöst (BERGDOLL, 1989). Die Inkubationszeit beträgt dabei wenige Stunden, die Erkrankung ist meist selbstlimitierend und in ein bis zwei Tagen überstanden.

Neben den menschlichen Reservoirern findet man *S. aureus* auch im veterinärmedizinischen Bereich, insbesondere als einen der häufigsten Mastitiserreger bei Milchkühen (FLUIT, 2012; PANTOSTI, 2012). Die Kontamination von Lebensmitteln tierischen Ursprungs kann sowohl im Bereich der Primärproduktion von den Tieren selbst stammen, als auch durch den mit der weiteren Verarbeitung betrauten Menschen erfolgen.

Bezüglich der Kenntnisse über die Erkrankungshäufigkeit liegen ähnliche Verhältnisse vor, wie die in Abschnitt 2.1.3 hinsichtlich *B. cereus* geschilderten. Auch für lebensmittelbedingte Erkrankungen durch *S. aureus* bzw. seine Enterotoxine besteht in Deutschland keine Meldepflicht. Dem Bundesamt für Risikobewertung (BfR) wurde im Jahr 2009 ein Ausbruch, der auf eine Kontamination mit SE zurückzuführen war, gemeldet (HARTUNG & KÄSBOHRER, 2011). Bei der EFSA gingen für das Jahr 2010 aus neun EU-Mitgliedsstaaten Meldungen über 38 Ausbrüche („strong evidence outbreaks“; siehe 2.1.3) mit insgesamt 941 Erkrankungen ein. Deutschland war daran mit 2 Ausbrüchen und 24 Erkrankungsfällen beteiligt. Die bereits in Abschnitt 2.1.3 erwähnte US-amerikanische Studie von SCALLAN et al. (2011) gibt die Zahl der jährlich zu erwartenden SE-bedingten Erkrankungen mit 241.148 an (90 % Vertrauensbereich: 72.341-529.417). Somit wäre *S. aureus* dort der fünfthäufigste Erreger von mikrobiellen, durch Lebensmittel übertragenen Erkrankungen.

2.2.4 Nachweisverfahren

Aus praktischen Erwägungen, und da das Koagulasebildungsvermögen als eines der wichtigsten Pathogenitätsmerkmale bei Staphylokokken gilt, werden bei der kulturellen Untersuchung von Lebensmitteln in der Regel nur koagulasepositive Staphylokokken (KPS) nachgewiesen. Allerdings dürften die übrigen koagulasepositiven Spezies (im Wesentlichen *S. intermedius* und *S. hyicus*) neben *S. aureus* nur eine untergeordnete Rolle spielen (BECKER et al., 2007).

Momentan existieren auf nationaler, europäischer und internationaler Ebene drei standardisierte Methoden zum Nachweis von KPS. Es handelt sich dabei um zwei Koloniezählverfahren bei 37 °C, einmal mit Baird-Parker-Agar (DIN EN ISO 6888-1), zum anderen mit Kaninchenplasma-/Fibrinogen-Agar (DIN EN ISO 6888-2), sowie um ein MPN-Verfahren für niedrige Keimzahlen mit einer Anreicherung in modifizierter Giolitti-Cantoni-Bouillon und anschließender Subkultivierung auf einem der beiden genannten festen Nährböden (DIN EN ISO 6888-3). Beim Baird-Parker-Agar (BAIRD-PARKER, 1962) handelt es sich um einen Selektivnährboden, der neben die Begleitflora hemmenden (Tellurit, Lithiumchlorid, Glycin) als indikative Komponenten Tellurit (Schwarzfärbung der Kolonien durch Telluritreduktion) und Eigelb (Hofbildung infolge einer Lecithinaseaktivität) enthält. Tellurit hat demnach eine zweifache Funktion. Der Zusatz von Pyruvat soll die Wiederbelebung geschädigter Keime fördern. Die Bestätigung verdächtiger Kolonien erfolgt mit dem Koagulasetest im Röhrchen. Der Kaninchenplasma-/Fibrinogen-Agar ist eine

Modifikation des Baird-Parker-Agars mit Zusatz der beiden namensgebenden Komponenten, wodurch eventuell vorhandene Koagulase direkt, ohne eine Bestätigung durch den Koagulasetest im Röhrchen, nachgewiesen werden kann (BECKERS et al., 1984). Die beim MPN-Verfahren verwendete modifizierte Giolitti-Cantoni-Bouillon (CHOPIN et al., 1985) ist ähnlich zusammengesetzt wie der Baird-Parker-Agar, enthält aber zur Verbesserung der Produktivität Tween 80 und keinen Agar. Einzelheiten zu den Verfahren und Nährböden finden sich bei (ZANGERL & BECKER, 2012).

Die Dauer der Untersuchung beträgt beim Verfahren mit Baird-Parker-Agar 48 Stunden, dazu kommen für die Bestätigung mit dem Koagulasetest im Röhrchen 24-48 Stunden. Der Zeitaufwand für das Verfahren mit Kaninchenplasma-/Fibrinogen-Agar reduziert sich auf 24-48 Stunden, da der Koagulasetest bereits in den Nährboden integriert ist. Beim MPN-Verfahren liegt die Bebrütungszeit des flüssigen Mediums bei 24-48 Stunden. Hinzu kommt die Inkubation des jeweils verwendeten festen Nährbodens, von dem auch die Dauer für die Bestätigung verdächtiger Kolonien abhängt.

Es sind mehrere Tests zum Nachweis oder der Identifizierung von *S. aureus* im Fachhandel verfügbar. Diese basieren auf kulturellen, immunologischen, biochemischen, molekularbiologischen, oder massenspektrometrischen Verfahren (BECKER & MÄRTLBAUER, 2011). Aufgrund schneller Nachweiszeiten eignen sich hier besonders die molekularbiologischen und immunologischen Techniken. Zum Nachweis der Enterotoxine sind im Fachhandel ebenfalls eine Reihe von Verfahren, meist auf enzymimmunologischer Basis, verfügbar. Ein Überblick findet sich bei BECKER et al. (2007).

2.3 Antikörper gegen *B. cereus*

Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern (pAk) zur Serotypisierung von Keimen mittels Agglutinationsreaktion ist ein seit langem etabliertes Verfahren und in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben. Dies gilt auch für die beiden im Focus der vorliegenden Arbeit stehenden Spezies *B. cereus* und *S. aureus* (MELCONIAN et al., 1983; STANZEL, 1994; GUIDRY et al., 1998). Diese Seren sind jedoch nur bedingt für diagnostische immunologische Nachweisverfahren einsetzbar. Die folgenden Ausführungen beschränken sich daher auf neuere Literatur zu entsprechend validierten Antikörpern – insbesondere monoklonalen Antikörpern – und deren Einsatz in Enzymimmuntests. Allerdings ist die Literatur zur Herstellung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen *B. cereus* (-Sporen) übersichtlich, *B. anthracis* steht hier aufgrund seiner pathogenen Eigenschaften als Milzbranderreger und als potentielle Waffe im Bioterrorismus stärker im Rampenlicht internationaler Forschung. Aufgrund seiner nahen Verwandtschaft mit *B. cereus* (IVANOVA et al., 2003; VILAS-BÔAS et al., 2007; KOLSTO et al., 2009) und der ähnlichen mikrobiologischen Eigenschaften, einschließlich der Sporenbildung, können Arbeiten zu *B. anthracis* allerdings gut zum Vergleich mit *B. cereus* herangezogen werden.

Bereits Anfang der 90er Jahre wurde ein mAk vom Subtyp IgM beschrieben, der mit 23 verschiedenen Flagella-Antigentypen von *B. cereus* reagierte und in einem indirekten EIA zu dessen Detektion eingesetzt wurde (MIKAMI et al., 1990). Es wurden Mäuse mit *B. cereus* Keimen in der Konzentration von McFarland 7, inaktiviert mit 0,1 %igem Formalin, immunisiert und die Antikörpertiter mittels Agglutinationstest überprüft. Nach den Zellfusionen wurden die ZKÜ mittels indirekter EIAs, in denen Flagella-Antigene von 23 Serovaren als Beschichtungsantigene eingesetzt wurden, auf Reaktivität überprüft. Der etablierte mAk reagierte gleich stark mit allen 23 Flagella-Antigenen der *B. cereus* Serovare und zeigte keine Reaktion mit analogen Präparationen von *B. subtilis*, *B. natto* und *Escherichia coli*. Allerdings wurde ein qualitativer Nachweis angestrebt und keine quantitativen Untersuchungen vorgenommen. Ein Jahr später nutzten MURAKAMI et al. (1991) diese Ergebnisse zu den Flagella-Antigenen, um ein indirektes EIA-System unter Einsatz von spezifischen Kaninchen-pAk zum Nachweis der 23 verschiedenen Serotypen zu erstellen, das die bis dahin verwendete Agglutinationsmethode zur Detektion von *B. cereus* in ihrer Sensitivität übertraf. CHARNI et al. (2000) beschrieben die Produktion und Charakterisierung von mAk gegen vegetative Formen von *B. cereus*, genaue Angaben zur Zusammensetzung des Immunogens sowie zur Immunisierung wurden jedoch nicht gemacht.

Die etablierten mAk reagierten mit Oberflächenproteinen (evtl. als Glykoprotein vorliegend) von *B. cereus*, Bazillen anderer Spezies zeigten keine Reaktion. Bei QUINLAN & FOEGEDING (1997) wird die Produktion von mAk gegen *Bacillus* und *Clostridium* Sporen beschrieben. Als Immunogen setzten sie eine Mischung aus jeweils 10^7 KbE Sporen der Spezies *B. cereus* und *Clostridium sporogenes*, die mit Formaldehyd inaktiviert worden waren, ein. Neben mAk, die Reaktionen mit 10^7 KbE *B. cereus* bzw. *Clostridium sporogenes* Sporen zeigten, konnte auch ein mAk vom IgM-Subtyp isoliert werden, der sowohl mit Sporen als auch mit vegetativen Formen von beiden Keimen reagierte. Die mAk, die mit Sporen von *B. cereus* reagierten, zeigten dagegen keine Reaktion mit vegetativen Formen. Um pAk und mAk gegen Sporen von *B. anthracis* zu generieren, immunisierten KUEHN et al. (2009) Mäuse, Kaninchen und ein Huhn mit Präparationen von inaktivierten Sporen bzw. einem Tetrasaccharid, das ein Teil des im Exosporium vorkommenden Glykoproteins „*Bacillus* collagen-like protein of *anthracis*“ (BclA) ist. Die Inaktivierung der Sporen erfolgte 30 min lang mit 1 % Peroxyessigsäure in 80 %igem Ethanol. Die Spezifität der Antikörper wurde anhand von 30 Bazillenstämmen und 11 Stämmen Gram-negativer Bakterien überprüft. Alle etablierten pAk und mAk, für deren Produktion als Immunogen inaktivierte Sporen eingesetzt wurden, reagierten auch mit dem Tetrasaccharid, was für eine starke Immunogenität dieses Zuckeranteils des Exosporiums spricht. TAMBORRINI et al. (2010) arbeiteten ebenfalls mit Zuckerbestandteilen von BclA. Sie immunisierten Mäuse mit jeweils 40 µg einer Präparation eines Disaccharids gekoppelt an das hochmolekulare Trägerprotein Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH). Insgesamt 6 mAk wurden auf diese Weise etabliert und eingehend untersucht. Ein Screening fand mit 25 Vertretern des Genus *Bacillus* statt, neben Reaktionen mit *B. anthracis* kreuzreagierten die mAk mit zwei Stämmen von *B. cereus*. Die mAk reagierten sowohl mit ihren Immunogenen, als auch mit Paraformaldehyd-inaktivierten Sporen. Die Sporen, mit denen die Tests durchgeführt wurden, wurden mit 10 %iger Paraformaldehydlösung inaktiviert. Trotz der hohen Konzentration an Paraformaldehyd gelang es TAMBORRINI et al. (2010), die Sporen mittels EIA und Immunfluoreszenz nachzuweisen, und konnten damit zeigen, dass die Zuckerbestandteile der Sporenoberfläche durch die Inaktivierung nicht ihre antigenen Eigenschaften verloren hatten.

Verschiedene Arbeiten zeigten, dass das EA1-Protein (extractable antigen 1) eine hoch immunogene Komponente von *Bacillus* Sporenpräparationen darstellt. EA1 kann sowohl in Sporen, als auch in vegetativen Formen von *B. anthracis* nachgewiesen werden. EA1, ein 100 kDa-Protein, stellt somit keinen spezifischen Sporenbestandteil dar, ist aber erfahrungsgemäß an das Exosporium der Sporen angelagert (EZZELL & ABSHIRE, 1988).

In einer Veröffentlichung von WANG et al. (2009b) werden mAk gegen dieses Protein beschrieben. Als Immunogen dienten Präparationen von 10^6 Sporen, die mittels 1,5 %igem Formaldehyd inaktiviert worden waren und 6 Wochen alten BALB/c-Mäusen subkutan verabreicht wurden. Insgesamt 3 gewonnene mAk zeigten in indirekten EIA Reaktionen mit Sporen von *B. anthracis*, aber nicht mit Sporen von 10 weiteren Bazillenspezies. Bei Einsatz dieser mAk in einem Sandwich-EIA wurden auch Reaktionen mit vegetativen Formen von *B. anthracis* beobachtet. Die mAk zeigten sich reaktiv mit Sporen von 3 Stämmen *B. anthracis* und einem Stamm *B. pumilus*. Weitere Bazillen, auch andere Mitglieder der Cereus-Gruppe, reagierten nicht. Die Sensitivität wurde allerdings nicht weiter untersucht, alle Untersuchungen fanden mit einer Bakterienkonzentration von 10^7 KbE/ml statt. Es gelang WANG et al. (2009b) auch, die Reaktivität der mAk mit lebenden Zellen in der Immunfluoreszenz nachzuweisen. WALPER et al. (2012) produzierten rekombinante Einzeldomänenantikörper (sdAk) gegen EA1 basierend auf einer Phagen-Display-Bibliothek von Lama-Lymphozyten. Die Lamas wurden mit lebenden Sporen des *B. anthracis* Stammes Sterne 34F2 immunisiert. Die auf diese Weise gewonnenen sdAk reagierten ebenfalls sowohl mit vegetativen Formen als auch Sporen von *B. anthracis*. Die Reaktivität mit 8 Stämmen der Cereus-Gruppe und einem *B. subtilis* Stamm war deutlich geringer, nicht-*Bacillus* Spezies zeigten keine Reaktion. Mit einem optimierten Sandwich-Verfahren unter Verwendung von Luminex-Perlen konnte eine Nachweisgrenze von 10^4 KbE/ml für Sporen und vegetative Formen von *B. anthracis* erreicht werden.

KUEHN et al. (2009) konnten $1-5 \times 10^4$ KbE/ml inaktivierte Sporen von *B. anthracis* mittels Sandwich-EIA nachweisen. Es wurden mehrere Antikörperpaare im Sandwich-Verfahren getestet, ein Versuchsaufbau erreichte sogar eine Nachweisgrenze von 4×10^3 KbE/ml, allerdings führten KUEHN et al. (2009) selbst an, dass dieses Antikörperpaar noch weiter auf Spezifität überprüft werden muss. Die Spezifität der polyklonalen Antikörper wurde anhand von 30 Bazillenstämmen und 11 Stämmen Gram-negativer Bakterien überprüft. Es reagierten alle *B. anthracis* Stämme, und je nach Antikörper 1-4 *B. cereus* Stämme. Andere Bakterien zeigten keine Reaktion. Es gelang ebenfalls, inaktivierte Sporen von *B. anthracis* mit poly- und monoklonalen Antikörpern in der Immunfluoreszenz nachzuweisen. In einem Luminex Sandwich-Verfahren, bei dem *B. anthracis* Sporen mit Antikörpern an Mikrokügelchen gebunden und mittels Fluoreszenz nachgewiesen wurden, detektierte TAMBORRINI et al. (2010) erfolgreich 10^3-10^4 KbE/ml. Die Spezifität des Luminex-Verfahrens wurde anhand von 6 Stämmen *B. anthracis*, 5 Stämmen *B. cereus*, 2 Stämmen *B. thuringiensis* und 12 Bazillenstämmen, die nicht zur Cereus-Gruppe gehören,

überprüft. Alle *B. anthracis* Stämme und zwei *B. cereus* Stämme reagierten positiv, alle anderen eingesetzten Stämme zeigten keine Reaktion. Die Nachweisgrenze von 10^3 - 10^4 KbE/ml wurde auch von GÓMEZ DE LA TORRE et al. (2012) mittels „proximity ligation assay“ (PLA) für Sporen von *B. globigii* erreicht. Dieses Nachweisverfahren kombiniert die Vorteile eines Sandwich-EIAs mit der Sensitivität der PCR, indem mit spezifischen Nukleotidsequenzen markierte Antikörper eingesetzt werden, gebundene Antikörper werden dann durch DNA-Amplifikate nachgewiesen.

2.4 Antikörper gegen *S. aureus*

Aufgrund der pathogenen Bedeutung von *S. aureus* (2.2.3) fokussieren sich die meisten immunologischen Untersuchungen zu diesem Keim auf eine aktive oder passive Impfung, die eine Infektion verhindern oder deren Symptome abmildern soll (BRÖKER & VAN BELKUM, 2011; DREISBACH et al., 2011; DAUM & SPELLBERG, 2012). Seltener wird die Produktion von Antikörpern beschrieben, die auch in diagnostischen Verfahren eingesetzt werden können. Im Folgenden werden beispielhaft einige der derzeit verfügbaren Arbeiten vorgestellt.

Bei HALL et al. (2003) wird die Produktion und die Charakterisierung eines mAk (mAk 12-9, Tefibazumab, Handelsname Aurexis®) gegen den Clumping Factor A (ClfA), einen Pathogenitätsfaktor von *S. aureus*, beschrieben (PATTI, 2004; DOMANSKI et al., 2005; JOHN, 2006). Hierzu wurden Mäuse mit rekombinanten Teilstücken von ClfA, die in *Escherichia coli* produziert wurden, immunisiert. Ein mAk wurde aufgrund seiner Eigenschaft, die Bindung von Fibrinogen an ClfA zu inhibieren, selektiert und weiter untersucht. In der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie reagierte der mAk mit allen getesteten klinischen *S. aureus* Isolaten. Ein ClfA knockout Stamm zeigte keine Reaktion. Ein weiteres spezifisches Oberflächenprotein von *S. aureus*, Protein-A, wurde von KIM et al. (2012) zur Herstellung von mAk eingesetzt. Um Antikörper gegen Protein-A herzustellen und dabei die Problematik zu umgehen, dass Protein-A unspezifisch an den Fc-Teil von Immunglobulinen bindet, setzten die Autoren ein rekombinantes Protein SpA_{KKAA} ein, das im Vergleich zum natürlichen Protein-A jeweils 4 Aminosäuresubstitutionen in den fünf immunglobulinbindenden Domänen enthält. Die aus den Zellfusionen gewonnenen ZKÜ wurden mittels indirekter EIAs getestet, bei denen als Beschichtungsantigene verschiedene Polypeptidbruchstücke des Immunogens bzw. einzelne Ig-bindene Domänen von SpA_{KKAA}

verwendet wurden. Es wurden 3 mAk selektiert, die in einem Mäuseinfektionstest mit 10^7 KbE *S. aureus* neutralisierende Eigenschaften zeigten. SANDHU et al. (2012) arbeiteten mit einem weiteren Bestandteil der Zelloberfläche von *S. aureus*, einem Glycinpentamer, das als Verbindung zwischen Peptidoglykanen in der Zellwand fungiert. Sie synthetisierten einen Vorläufer eines dieses Pentamer enthaltenden Peptidoglykans und koppelten diesen kovalent an bovines Serumalbumin (BSA). Das Konjugat wurde, emulgiert in Freundschem Adjuvans, zur Immunisierung eines Schafes eingesetzt. Mittels indirekter EIAs konnten Reaktionen des Antiserums mit verschiedenen, während der Synthese des Immunogens anfallenden Zwischenstufen und mit dem als Immunogen verwendeten BSA-Konjugat selbst nachgewiesen werden. Die im EIA nachweisbare Reaktivität des Serums mit Zellwandpräparationen von verschiedenen Staphylokokkenstämmen war jedoch limitiert.

Um humane mAk gegen ein Poly-*N*-Acetylglucosamin der Zelloberfläche von *S. aureus* zu gewinnen, transformierten KELLY-QUINTOS et al. (2006) B-Zellen eines Patienten, der drei Jahre zuvor an *S. aureus* Bakteriämie erkrankt war, mit Epstein-Barr Viren und führten ein Screening auf Produktion von spezifischen Antikörpern gegen ihr Zielantigen mittels indirekter EIAs durch. Positiv reagierende Zellen wurden dann mit einer Mensch-Maus-Hybrid-Myelomzelllinie fusioniert. Auf diese Weise wurden drei mAk vom Subtyp IgG₂ gewonnen KELLY-QUINTOS et al. (2006). Im Hinblick auf die bessere klinische Einsetzbarkeit von Antikörpern des IgG₁-Subtyps wurden die Genomsequenzen der Hybridomzelllinien, die die variablen Regionen der mAk kodierten, ermittelt, amplifiziert und in Vektoren übertragen, die schon die konstanten Regionen von humanen Subtyp IgG₁-Antikörpern enthielten. Mittels dieser Vektoren wurden produktive Zelllinien (chinese hamster ovary, CHO) transfiziert und humane IgG₁-Antikörper gewonnen, die die Spezifität der ursprünglichen mAk beibehielten. Die Reaktion dieser mAk mit lebenden *S. aureus* Keimen konnte mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. WAGSTAFFE et al. (2012) produzierten mAk gegen das *S. aureus* Exoprotein Thernonuklease (TNase). Dazu immunisierten sie Mäuse mit einem kommerziellen TNase-Präparat unter Einsatz von Alaun als Adjuvans. Die gewonnenen, spezifische mAk produzierenden Hybridomzellen fusionierten sie erneut mit Milzzellen von Mäusen, die mit Fluorophor-Protein-Konjugaten (Rhodamin bzw. Fluorescein) immunisiert worden waren. So generierten sie Hybridomzelllinien, die bispezifische Antikörper produzierten, die sowohl an TNase, als auch an die Fluorophore banden, wobei jede dieser Bindungen auf je einer antigenbindenden Domäne der mAk basierte. Alle produzierten bispezifischen mAk ($n = 63$) banden sowohl an TNase, als auch an ihre jeweiligen Fluorophor-Protein-Konjugate. In einem Screening wurden mAk

selektiert, deren Affinität für die Fluorophore oder deren Trägerproteine schwächer war, als die Bindung an TNase. Diese Eigenschaft führte dazu, dass – auch aus sterischen Gründen – bei Bindung von TNase an die eine antigenbindende Domäne das von der zweiten Domäne gebundene Fluorophor dissoziierte. Die Freisetzung der Fluorophore aus der Bindung mit den Antikörpern resultierte in einer Erhöhung der messbaren Fluoreszenzintensität, was als positives Signal für die Anwesenheit von TNase in der Probe gemessen wurde. WAGSTAFFE et al. (2012) beschrieben den Test als qualitativ, es wurden keine weiteren Angaben zur Sensitivität des Verfahrens gemacht.

2.5 Bioaffinitätschromatographie und andere Biosensorsysteme

Unter Bioaffinitätschromatographie versteht man die Separation von Analyten aus flüssigen Matrices infolge der selektiven Bindung der Zielanalyten an geeignete Liganden. Nach Entfernung der sonstigen Probenmatrixbestandteile mittels Waschschritten erfolgt die Elution der gebundenen Komponenten unter Verwendung effizienter Elutionsmittel wie z.B. saurer Puffer oder organischer Lösungsmittel. Durch dieses Vorgehen können nicht nur spezifisch die Zielanalyten von der Probenmatrix getrennt werden, sondern auch durch den Durchsatz von hohen Probenmengen nebst Elution mit kleineren Volumina die Konzentrationen der gewünschten Analyten deutlich erhöht werden. Dadurch wird die nachfolgende Detektion erleichtert oder je nach Nachweisgrenze der eingesetzten Verfahren, erst ermöglicht (HAGE, 1999; MOSER & HAGE, 2010).

Schon lange werden Matrices wie quervernetzte Agarose (Sephacrose), Cellulose und andere organische Verbindungen eingesetzt um Antikörper, Lektine, Aptamere oder Proteine mit besonderen Bindungseigenschaften kovalent zu immobilisieren und in chromatographischen Verfahren zu nutzen (HAGE et al., 2012). Problematisch bei diesen Matrices ist zumeist, dass es sich um relativ weiche, druckinstabile Materialien handelt, wodurch sowohl die Flussgeschwindigkeit, als auch das aufgetragene Probenvolumen limitiert wird (MOSER & HAGE, 2010). Andere, auf Bioaffinität basierende Konzentrierungsverfahren, wie die immunomagnetische Separation, sind in der Regel nur für kleine Probenvolumina einsetzbar (PAPPERT et al., 2010; ESTEBAN-FERNÁNDEZ DE ÁVILA et al., 2012), so dass die mit diesen Systemen faktisch realisierbare Aufkonzentrierung der Analyten begrenzt ist. Um dieses Problem zu umgehen, wurden viele weitere Matrices entwickelt, von denen gerade in den letzten Jahren die monolithischen

Bioaffinitätschromatographiesäulen, die sich durch eine hohe Stabilität und Flexibilität auszeichnen, vermehrt eingesetzt werden (TETALA & VAN BEEK, 2010). Von besonderem Vorteil ist hierbei die Möglichkeit, Monolithen mit sehr genau definierten Porengrößen zu schaffen, die über den gesamten Säulenquerschnitt konstant verteilt sind (PESKOLLER et al., 2009; OTT et al., 2011) und somit hohe Flussraten ermöglichen (PODGORNIK et al., 2000).

Ein kritischer Punkt bei der Verwendung von Antikörpern als Liganden in der Bioaffinitätschromatographie ist deren Immobilisierung auf der Säulenmatrix. Auf der einen Seite müssen möglichst viele Antikörper gebunden werden, um später möglichst viele Analyten zurückzuhalten, auf der anderen Seite ist es aber nicht gewährleistet, dass die spezifische Bindungsaktivität der Antikörper nach der Bindung an die Säulenmatrix erhalten bleibt. Deswegen muss jeweils die Kompatibilität der ausgewählten Antikörper für diese Systeme getestet werden (FAYE et al., 2012). Weitere mögliche Liganden für Bioaffinitätsanalysen sind Aptamere, die in den letzten Jahren immer häufiger produziert und eingesetzt werden (MAIRAL et al., 2008). Gegen Sporen von *B. anthracis* gerichtete Aptamere werden von BRUNO & CARRILLO (2012) beschrieben, die sowohl lebende Sporen, als auch Zuckerbestandteile des Exosporiums, die sie kovalent an magnetische Kügelchen banden, zur Selektion einsetzten. Zwei Aptamere, die nach einem Screening mit lebenden Sporen isoliert wurden, wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und mittels Messung der Änderungen des Fluoreszenzanregungsspektrums bei stattfindender Bindung an ihre Zielmoleküle weiter untersucht. Sie reagierten mit Sporen, aber nicht mit dem untersuchten Zuckerbestandteil des Exosporiums. Die erreichten Nachweisgrenzen lagen bei $3\text{--}6 \times 10^4$ KbE/ml. Die Aptamere, die mit dem an magnetischen Kügelchen immobilisierten Zuckerbestandteil produziert wurden, reagierten aber nicht oder nur kaum mit intakten Sporen. CAO et al. (2009) beschreiben die Produktion von Aptameren gegen *S. aureus* basierend auf einem Screening mit methanolfixierten, ganzen Keimen. Insgesamt fünf Aptamere wurden genauer untersucht, und aufgrund ihrer Bindung an unterschiedliche Bestandteile von *S. aureus* als Mischung zur Detektion der Keime eingesetzt. Es gelang unter Einsatz dieser Mischung, drei *S. aureus* Stämme nachzuweisen. Drei andere Bakterienspezies zeigten keine signifikanten Kreuzreaktionen.

Die Bioaffinitätschromatographie wird immer häufiger erfolgreich eingesetzt, um Bakterien und andere mikrobiologische Agenzien, z.B. Viren, zu reinigen, zu konzentrieren oder zu trennen (DAINIAK et al., 2005; KRAMBERGER et al., 2010; OTT et al., 2011). Ziel ist es hierbei, wie in der vorliegenden Arbeit, die Konzentrationen der Bakterien so weit zu erhöhen, dass ein erfolgreicher Nachweis durch Analyse der Säuleneluate auch bei sehr

kleinen Ausgangskeimzahlen möglich wird und somit zeitintensive Anreicherungsschritte zu vermeiden. In einer Studie zur Anreicherung von Salmonellen wurde beispielsweise eine Konzentrationssteigerung um Faktor 500 in einer konventionellen Säulenmatrix erreicht (BREWSTER, 2003). Unter Einsatz von monolithischen Säulen wurde für *Escherichia coli* aus Wasserproben eine Konzentrationssteigerung um Faktor 250 (PESKOLLER et al., 2009) beschrieben, für hitzeinaktivierte *S. aureus* in PBS wurde die Nachweisgrenze eines durchflusszytometrischen Verfahrens um Faktor 130 verbessert (OTT et al., 2011). In Kombination mit geeigneten Nachweisverfahren ist es also möglich, Bakterien aus Proben innerhalb weniger Stunden nachzuweisen, was in den konventionellen Verfahren (s. 2.1.4 und 2.2.4) bisher nur in Tagen möglich war (STEVENS & JAYKUS, 2004; BREHM-STECHER et al., 2009).

Mit weltweit ansteigender Lebensmittelproduktion werden Biosensorsysteme zum schnellen Nachweis von mikrobiologischen und anderen Kontaminationen in Lebensmitteln immer wichtiger. Es gibt eine Reihe von jüngeren Übersichtsartikeln, die sich mit den aktuellen Trends beschäftigen (AHMED et al., 2008; PALCHETTI & MASCINI, 2008; ARORA et al., 2011; GUO, 2012; MCGRATH et al., 2012; NARSAIAH et al., 2012). Aufgrund der Komplexität der verschiedenen Systeme würde es den Rahmen der vorliegenden Arbeit bei weitem sprengen einen umfassenden Überblick zu diesen Nachweisverfahren zu geben. Die im folgenden angeführten Beispiele sollen daher nur einen Einblick in die wachsende Vielfalt dieser Systeme ermöglichen, Details zu den verschiedenen Systemen sind in den oben angeführten Übersichtsarbeiten aufgeführt.

Für die Matrix Milch sind Biosensoren aufgrund der großen Probenzahlen besonders interessant. So wurde zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch ein System entwickelt, das 13 Antibiotika gleichzeitig nachweisen kann (KLOTH et al., 2009). Dasselbe System wurde ebenfalls zum Nachweis von Mikroorganismen in Wasser eingesetzt, für *Escherichia coli* wurden Nachweisgrenzen von 3×10^3 KBE/ml angegeben (WOLTER et al., 2008). In einem anderen Biosensorsystem basierend auf antikörperbeschichteten Nanopartikeln in Kombination mit einem Kernspinresonanz-Filtersystem konnten LEE et al. (2009) bis zu 20 KBE *Mycobacterium tuberculosis* pro ml erfolgreich innerhalb von 30 min nachweisen, und demonstrierten damit die hohe Sensitivität und Schnelligkeit ihres Systems.

In einer Arbeit mit einem Surface Plasmon Resonance (SPR)-basierten Biosensorsystem für *B. anthracis* Sporen erreichten WANG et al. (2009a) Nachweisgrenzen von 10^4 KBE/ml. Bei der SPR-Untersuchung wird die Änderung der Lichtbrechungseigenschaften einer Liganden-beschichteten Oberfläche ausgenutzt, die entsteht, wenn eine Bindung an einen

Analyten stattfindet. Der eigens produzierte mAk, der hierbei zum Einsatz kam, zeigte zuvor im Sandwich-EIA eine Nachweisgrenze von 10^5 - 10^6 KbE/ml, die durch das SPR-Verfahren also deutlich verbessert wurde. Ebenfalls mittels SPR konnten SUBRAMANIAN et al. (2006) *S. aureus* Keimzahlen von 10^5 KbE/ml innerhalb von zwei Stunden unter Einsatz eines kommerziellen Antikörpers erfolgreich nachweisen. In einer Studie von ESTEBAN-FERNÁNDEZ DE ÁVILA et al. (2012) wird ein amperometrischer immunomagnetischer Sensor beschrieben, der auf einem kompetitiven Sandwich-EIA unter Einsatz von nicht näher beschriebenen, kommerziellen polyklonalen Antikörpern gegen Protein-A beruht und eine sehr niedrige Nachweisgrenze erreicht. Nach einem Lyse-Schritt wird das freiwerdende Protein-A nachgewiesen, wobei die rechnerische Nachweisgrenze in fettarmer Milch mit 1 KbE/ml angegeben wurde.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

6-Amino-n-Caprinsäure (Sigma-Aldrich, A2504)
Aktivierte Peroxidase (Roche, 11 428 861 001)
Aminopterin (Sigma-Aldrich, A5159)
Biotinamidocaprinsäure N-hydroxy-succinimidester (Sigma-Aldrich, B2643)
Bovines Serumalbumin (Sigma-Aldrich, A4514)
Bradford Reagenz (Sigma-Aldrich, B6916)
Bromphenolblau (Merck, 8122)
Casein Natriumsalz aus Kuhmilch (Sigma-Aldrich, C8654)
Citronensäure-Monohydrat (Merck, 1.00244.5000)
CNBr-aktivierte Sepharose (GE Healthcare, 17-0430-01)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (Roche, 04693124001)
Deoxyribonuclease I (Sigma-Aldrich, D4527)
Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (Roche, 11333054001)
Dulbecco's Medium (Biochrom AG, F0435)
Ethylendiamintetraacetat (Sigma-Aldrich, E1644)
Fetales Kälberserum (Biochrom AG, S0115)
Gelatine (Sigma-Aldrich, G6144)
Hefeextrakt (Oxoid, LP0021)
Humanes Serumalbumin (Sigma-Aldrich, A1653)
Hypoxanthin/Thymidin Supplement (Sigma-Aldrich, H0137)
Light Cycler 480 SYBR Green I Master (Roche, 03515885001)
LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare, 17-0446-01)
Lysostaphin (Sigma-Aldrich, L4402)
Magermilchpulver (Oxoid, LP0031)
Natriumborhydrid (Sigma-Aldrich, S9125)
Natriumdodecylsulfat (SERVA Electrophoresis GmbH, 20765)
Natriumpyruvat (Biochrom AG, L0473)

Nutrient Broth (Oxoid, CM0001)
Paraformaldehyd (Fluka, 76240)
PhastGel Blue R (Sigma-Aldrich, B4921)
Polyethylenglycol 1500 (Roche, 10783641001)
Ponceau S (Sigma-Aldrich, P7170)
Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad, 161-0373)
Protein-A (Sigma-Aldrich, P6031)
Protein-A Agarose (Bio-Rad, 153-6159)
Proteinase K (Roth, 7528.1)
Protein Hydrolysate Amicase (Fluka, 82514)
Ringerlösung (Oxoid, BR0052G)
Ribonuklease A (Roth, 7156.1)
SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, 37075)
Tetranitromethan (Sigma-Aldrich, T25003)
Trizma Hydrochlorid (Tris) (Sigma-Aldrich, T3253)
Trizma Base (Sigma-Aldrich, T1503)
Tryptone Enzymatic Digest from Casein (Fluka, 95039)
Trypton Soja Bouillon (Oxoid, CM0129)

Alle anderen, nicht eigens aufgeführten Reagenzien wurden in pro analysi-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich bzw. Merck KGaA bezogen.

3.1.2 Lösungen und Puffer

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS), 0,013 mol/l, mit Zusatz von 0,013 mol/l NaCl, pH 7,4

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline, TBS), 0,02 mol/l mit Zusatz von 0,013 mol/l NaCl, pH 7,6

Western-/Immunoblotting:

Anodenpuffer I: 37,2 g Trizma Base, 200 ml Methanol, mit A. dest. auf 1 l auffüllen

Anodenpuffer II: 3,02 g Trizma Base, 200 ml Methanol, mit A. dest. auf 1 l auffüllen

Kathodenpuffer: 5,24 g 6-Amino-n-Caprönsäure, 3,02 g Trizma Base, 200 ml Methanol, mit A. dest. auf 1 l auffüllen

Enzymimmuntest (enzyme immunoassay, EIA):

Bicarbonatpuffer: 0,05 mol/l, pH 9,6

Waschlösung: 85,5 g NaCl, 2,5 ml Tween® 20, 10 l A. dest.

Citratpuffer: 0,23 mol/l, mit 1 mol/l KOH pH auf 3,95 einstellen, danach 168 µl H₂O₂ zusetzen

Tetramethylbenzidinlösung: 252 mg Tetramethylbenzidin, 5 ml Aceton, 45 ml Methanol

Substrat/Chromogenlösung: 20 Teile Citratpuffer, 1 Teil Tetramethylbenzidin-Lösung

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Bromphenolblaulösung: 0,3 % (g/v) Bromphenolblau in A. dest.

SDS-Puffer: 0,03 mol/l Tris/HCl-Puffer (pH 8), 0,03 mol/l EDTA, 7,5 % (g/v) SDS

Coomassie-Färbelösung: 1 Tablette PhastGel Blue R, 120 ml Methanol, 80 ml A. dest., kurz vor Verwendung 10 % (v/v) Eisessig zugeben

Coomassie-Entfärbelösung: 50 ml Essigsäure 100 %, 150 ml Methanol, 300 ml A. dest.

Coomassie-Fixierlösung: 25 ml Glycerin, 50 ml Essigsäure 100 %, 425 ml A. dest.

Herstellung von HRP-Konjugaten:

Kopplungspuffer: 10 mmol/l K_2HPO_4 -Puffer (pH 8) mit Zusatz von 50 mmol/l NaCl

0,5 mol/l Natriumcarbonatpuffer (pH 9,5)

2 mol/l Triethanolaminlösung (mit 1 mol/l HCl auf pH 8 einstellen)

200 mmol/l Natriumborhydridlösung

1 mol/l Glycin-Lösung (mit 1 mol/l NaOH auf pH 7 einstellen)

Kopplung von Antikörpern an CNBr-aktivierte Sepharose:

Kopplungspuffer: 0,1 mol/l NaHCO_3 , 0,5 mol/l NaCl (pH 8,3)

Blockierungspuffer: 0,1 mol/l Tris (mit 1 mol/l HCl auf pH 8 einstellen)

Waschpuffer I: 0,1 mol/l Essigsäure, mit Zusatz von 0,5 mol/l NaCl (mit 1 mol/l Natriumacetatlösung auf pH 4 einstellen)

Waschpuffer II: 0,1 mol/l Tris, mit Zusatz von 0,5 mol/l NaCl (mit 1 mol/l HCl auf pH 8 einstellen)

Bioaffinitätschromatographie:

Elutionspuffer: 100 mmol/l Glycin, mit Zusatz von 150 mmol/l NaCl und 0,1 % (v/v) Tween® 20 (mit 1 mol/l HCl auf pH 3 einstellen)

Magermilch: 10 % (g/v) Magermilchpulver in A. dest.

3.1.3 Nährmedien

Feste Nährmedien:

Bacillus cereus Selective Medium Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannitol-Bromthymolblau-Agarplatten (PEMBA; Oxoid, PO5048A)

Columbia Agar mit Schafblut Plus (Oxoid, PB5039A)

Standard Plate Count Agar (APHA) (Oxoid, PO5013A)

Flüssige Nährmedien:

Embrapa-Medium [Sporulationsmedium nach MONNERAT et al. (2007)]:

8 g Nutrient Broth, 1 g Hefeextrakt, 1 g KH_2PO_4 , 1 mg CaCO_3 , 1 mg $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1 mg $\text{MnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, mit A. dest. auf 1 l auffüllen, pH mit NaOH auf 7 einstellen

Sporulationsmedium nach STEWART et al. (1981):

1 g Protein Hydrolysate Amicase, 1 g Tryptone Enzymatic Digest from Casein, 0,4 g Hefeextrakt, 1,769 g KH_2PO_4 , 4,529 g K_2HPO_4 , 0,044 g $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,102 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,014 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,0019 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 0,007 g ZnCl_2 , 20 mg L-Glutamin, 0,6 g Glycerin 87 %, mit A. dest. auf 1 l auffüllen

Sporulation G-Medium [Sporulationsmedium nach CLIFF et al. (2005)]:

2 g Hefeextrakt, 0,4 g KH_2PO_4 , 0,5 g K_2HPO_4 , 25 mg $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,2 g MgSO_4 , 0,5 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 5 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 5 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g Glucose, mit A. dest. auf 1 l auffüllen, pH mit NaOH auf 7,0 – 7,5 einstellen

HT-Zellkulturmedium für Hybridomzellen:

500 ml Dulbecco's Medium, 100 ml FCS, 5 ml 100 mmol/l Natriumpyruvat, 10 ml 200 mol/l L-Glutamin, 5 ml Mercaptoethanol, 100 mmol/l Hypoxanthin, 16 mmol/l Thymidin; bei Verwendung als Selektionsmedium für fusionierte Zellen wurde 0,4 $\mu\text{mol/l}$ Aminopterin zugesetzt

3.1.4 Immunoreagenzien

Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Invitrogen, A11029)

Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, A11034)

Goat anti-Mouse IgG (Fc-specific) (Sigma-Aldrich, M4280)

Horse anti-Mouse IgG-HRP (H&L) (Cell Signaling, #7076)

Kaninchenserum (MP Biomedicals, 092941149)

Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents (Sigma-Aldrich, ISO2)

Rabbit anti-Mouse Ig-HRP (Dako, P0161)

Swine anti-Rabbit Ig-HRP (Dako, P0217)

Ziegenserum (MP Biomedicals, 092939149)

3.1.5 Geräte

Hybaid RiboLyser Homogenisator für Zellaufschluss (Hybaid GmbH)

Immunfluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence)

Kodak Image Station 200MM (Biostep)

Light Cycler 2.0 (Roche)

Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tecan)

NovaBlot Multiphor II (GE Healthcare)

PhastSystem Separation and Control Unit (Pharmacia)

3.1.6 Sonstige Materialien

Filterpapier Electrode Paper (GE Healthcare, 80-1106-19)

Immobilon-P Transfermembran, 0,45 µm (Millipore, IPVH304F0)

Lysing Matrix B (MP Biomedicals, 116911050)

Maus-Myelomzellen X63-Ag8.653 (DSM, ACC-43)

Mikrotiterplatten, 96 Loch (Nunc, 439454)

Mikrotiterplatten, 96 Loch, weiß (Nunc, 436110)

miniPERM Bioreaktor (Sarstedt, 94.6001.059)

PD-10 Säule (GE Healthcare, 17-0851-01)

PhastGel Probenauftragskämme 8/1 µl (GE Healthcare, 18-1617-01)

PhastGel Gradient 10-15 (GE Healthcare, 17-0540-01)

PhastGel SDS Pufferstreifen (GE Healthcare, 17-0516-01)

Sephacryl-S200 HR Säule (GE Healthcare, 17-0584-01)

UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, 12224-50)

3.2 Methodik

3.2.1 Enzymimmuntests (EIA)

3.2.1.1 Indirekte Verfahren

Zur Durchführung der indirekten EIA-Verfahren wurden je nach Fragestellung Mikrotiterplatten mit Antigenen (verdünnt in PBS) entweder in gleichbleibender Konzentration oder als Verdünnungsreihe beschichtet (100 µl/Kavität). Die Platten wurden dann in einer Kammer mit hoher Luftfeuchtigkeit entweder bei Raumtemperatur, bzw. wenn lebensfähige Bakterien als Beschichtungsantigen eingesetzt wurden, bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten abgesaugt falls Bakteriensuspensionen zur Beschichtung eingesetzt wurden, andernfalls entleert und anschließend auf einem Zellstoffstapel trocken geschlagen. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurden danach 150 µl einer 3 %igen (g/v) Casein/PBS-Lösung in die Kavitäten gegeben und die Platten 30 min lang in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur auf einem Taumler inkubiert. Nach erneutem Absaugen/Entleeren der Kavitäten wurden die Platten dreimal mit EIA-Waschlösung gewaschen und danach ausgeschlagen.

Im nächsten Schritt wurden die Antikörper, verdünnt in 1 %iger (g/v) Casein/PBS-Lösung, entweder in gleichbleibender Konzentration oder als Verdünnungsreihe zugegeben (100 µl/Kavität) und für 1 h inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift erfolgte anschließend die Zugabe der peroxidasemarkierten Sekundärantikörper (Rabbit anti-Mouse Ig-HRP bzw. Swine anti-Rabbit Ig-HRP; verdünnt 1:2000 in 1 %iger (g/v) Casein/PBS-Lösung; 100 µl/Kavität). Nach einer weiteren Stunde Inkubation wurden die Platten erneut entleert, 5 mal gewaschen und trocken geschlagen. Im letzten Schritt erfolgte die Zugabe von 100 µl Substrat/Chromogenlösung pro Kavität. Die Platten wurden für 20 min inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Schwefelsäurelösung (1 mol/l) gestoppt. Die Extinktion der Kavitäten bei 450 nm wurde dann in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät Sunrise Remote Control (Tecan) unter Verwendung der Ridasoft Win-Software (r-biopharm AG) gemessen.

3.2.1.2 Sandwich-Verfahren

Bei auf polyklonalen Antiseren basierenden Sandwich-EIA-Verfahren wurden Mikrotiterplatten über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit den spezifischen Antiseren (verdünnt in Bicarbonatpuffer, 100 µl pro Kavität) beschichtet. Das Blockieren der Kavitäten erfolgte am nächsten Tag mit 3 %iger (g/v) Casein/PBS-Lösung analog zum indirekten EIA-Verfahren. Nach Zugabe der Antigene (verdünnt in 0,5 %iger (v/v) Tween® 20/PBS-Lösung, 100 µl pro Kavität) in geeigneten Verdünnungsreihen und einer einstündigen Inkubation wurden die Kavitäten abgesaugt, 4 mal gewaschen und trocken geschlagen. Zum Nachweis der gebundenen Antigene wurden anschließend spezifische peroxidasemarkierte Primärantikörper (verdünnt in 1 %iger (g/v) Casein/PBS-Lösung) in geeigneten Verdünnungen zugegeben und die Platten für eine weitere Stunde inkubiert. Der weitere Verlauf (Zugabe der Substrat/Chromogenlösung, Abstoppen und Messung am Lesegerät) erfolgte analog zum indirekten Verfahren (3.2.1.1).

Beim Einsatz von monoklonalen Antikörpern (mAk) in Form von antikörperhaltigen Zellkulturüberständen (ZKÜ) wurde eine Variation des oben beschriebenen EIA-Verfahrens eingesetzt. Die Beschichtung der Platten erfolgte hierbei mit Fc-spezifischem Goat-anti-Mouse IgG (5 µg/ml). Nach einem Absättigungsschritt wurden die Platten für 1 h mit antikörperhaltigen ZKÜ (verdünnt in PBS) inkubiert. Der weitere Ablauf des Sandwich-EIAs (Antigenzugabe etc.) erfolgte analog zu der oben beschriebenen Vorgehensweise.

3.2.2 SDS-PAGE und Coomassie-Proteinfärbung

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde das PhastSystem von GE Healthcare verwendet. 20 µl der zu untersuchenden Lösungen wurden mit 10 µl SDS-Puffer und 1 µl Bromphenolblau-Lösung für 5-10 min im Wasserbad gekocht. Jeweils 1 µl dieser Ansätze wurde auf Gele mit einem Polyacrylamidgradienten von 10-15 % aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte ca. 25 min lang bei 250 V, 10 mA, 3 W, 65 Vh und 15 °C. Die elektrophoretisch getrennten Proteine wurden dann entweder mit Coomassie gefärbt, oder im Western-/Immunoblot verwendet.

Für die Proteinfärbung mit Coomassie wurde entweder frische Coomassie-Lösung hergestellt, oder vorhandene Lösung gefiltert. Die Gele wurden je nach Farbentwicklung für 30-60 min auf einem Taumler mit Coomassie-Färbelösung inkubiert und danach mit

Entfärbelösung behandelt, wobei nach 10 min Inkubation die Entfärbelösung gewechselt wurde. Anschließend wurde je nach Entfärbungsgrad das Gel für weitere 10-50 min inkubiert und danach in A. dest. eingelegt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Abschließend wurde das Gel für 10 min mit Fixierlösung behandelt.

3.2.3 Western-/Immunoblot

Das Semidry Blotting erfolgte in einer NovaBlot Multiphor II (Amersham Bioscience) Blottingkammer mit Electrophoresis Power Supply EPS 1001 (GE Healthcare). Die Proteine auf den Polyacrylamidgelen wurden luftblasenfrei eine Stunde lang bei 600 V, 17 mA und 30 W auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau-S Lösung 5 Minuten lang angefärbt und die Eichproteinbanden markiert.

Zur Blockierung der freien Proteinbindungsstellen wurde die Membran mit gefiltertem TBS mit Zusatz von 5 % (g/v) Magermilch und 0,1 % (v/v) Tween® 20 für 45-60 min auf einem Taumler unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der in TBS mit Zusatz von 5 % (g/v) Magermilch und 0,1 % (v/v) Tween® 20 verdünnten Antikörper (1 ml pro Blot). Nach 1 h Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 min in TBS-Lösung mit Zusatz von 0,1 % (v/v) Tween® 20 gewaschen. Dann erfolgte für 1 h die Zugabe des enzymmarkierten Sekundärantikörpers (Horse anti-Mouse IgG), 1:2000 verdünnt in TBS mit Zusatz von 5 % (g/v) Magermilch und 0,1 % (v/v) Tween® 20. Vor Zugabe des Substrates wurde der Blot 3-4 mal wie oben beschrieben gewaschen, wobei der letzte Waschschritt in TBS stattfand, ohne Zusatz von Tween® 20.

Abschließend wurde die Membran mit SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate nach Herstelleranweisung versetzt und die Lumineszenz an einer Kodak Image Station 200MM für in der Regel 3 min (1-5 min je nach Sichtbarkeit der Banden) gemessen. Die Auswertung erfolgte mittels KODAK 1D 3.6 Software.

3.2.4 Immunfluoreszenz

Für den Immunfluoreszenztest wurden Keimsuspensionen bei 4000 x g für 15 min abzentrifugiert und anschließend in 250 µl PBS mit Zusatz von 1 % (v/v) Tween® 20 aufgenommen. Die Keimgehalte lagen hierbei im Bereich von ca. 10⁸ KBE/ml. Die Ansätze

wurden dann mit spezifischen Antikörpern (polyklonale Antiseren 1:50 bzw. antikörperhaltige Zellkulturüberstände 1:10) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Keime in PBS aufgenommen und für 30 min mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Rabbit IgG bzw. Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Mouse IgG in 1:250-facher Verdünnung) inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert, das Pellet in 250 µl PBS aufgenommen und 10 µl des Ansatzes unter dem Immunfluoreszenzmikroskop beurteilt.

3.2.5 Generierung und Selektion von Hybridomzelllinien

Für die Zellfusionen wurden die *Lnn. axillares* und die Milzen von ausgewählten Mäusen steril entnommen und eine Einzelzellsuspension aus den Geweben gewonnen. Diese wurde dann mit Maus-Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 und Polyethylenglykol 1500 versetzt. Nach mehreren Waschschritten wurden die Fusionsprodukte in Mikrotiterplatten, die mit ca. 2500 murinen Peritonealmakrophagen pro Kavität vorbeschichtet waren, für 12 d bei 37 °C in einem Brutschrank mit 7 % Kohlenstoffdioxidatmosphäre inkubiert [KÖHLER & MILSTEIN (1975), modifiziert nach DIETRICH et al. (1998)].

Nach Inkubation der fusionierten Zellen wurden die Zellkulturüberstände mittels EIA auf spezifische Antikörperproduktion getestet. Positiv reagierende Zellen wurden mindestens dreimal mittels Endpunktverdünnung kloniert. Die Massenproduktion fand in miniPERM Bioreaktoren statt. Die gewonnenen Zellkulturüberstände wurden bioaffinitätschromatographisch über Protein-A-Agarose gereinigt. Die Isotypisierung erfolgte unter Verwendung eines Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kits.

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Produktion der Immunogene

3.3.1.1 Verwendete Stämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden entweder von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Präfix: DSM) bezogen oder stammten aus der Stammsammlung des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch (Präfix: MHI). Die Bakterien wurden auf Columbia Agar mit Schafblut angezüchtet, wöchentlich umgesetzt, und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Tab. 1 gibt einen Überblick zu den für die Herstellung der Immunogene eingesetzten Stämmen.

Tabelle 1: Zur Herstellung der Immunogene eingesetzte *B. cereus* bzw. *S. aureus* Stämme

Mikroorganismus	Bezeichnung	Quelle	Sporulationsvermögen bzw. Protein-A Produktion
<i>Bacillus cereus</i>	DSM 4384	DSM	+++
	DSM 4312	DSM	+++
	DSM 31	DSM	+/-
	MHI M1	Isolat aus Gewürzen	++++
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 20372	DSM	+
	DSM 20491	DSM	-
	MHI 379	Isolat aus Milch	+
	MHI 409	Isolat aus Kolostrum	+

3.3.1.2 Anzuchtbedingungen

3.3.1.2.1 *Bacillus cereus*

Vegetative Formen

Zur Generierung der Immunogene wurden die *Bacillus cereus*-Stämme DSM 4384 und DSM 31 verwendet. DSM 4384 ist aufgrund seiner Toxinbildung ein oft genutzter und gut etablierter Laborkeim, DSM 31 bildet nur sehr schwer bis überhaupt keine Sporen aus und

eignet sich deswegen besonders gut für die Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen vegetative Formen von *B. cereus*.

Koloniematerial der auf Columbia Agarplatten mit Schafblut angezüchteten Stämme wurde in 50 ml Trypton-Soja-Bouillon (TSB) verbracht und für 24 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad bei 60 Upm inkubiert. Danach wurden die Kulturen bei 4.000 x g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert, zweimal mit 20 ml steriler phospatgepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS) gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Nach Bestimmung der Keimzahl mittels Plate Count Verfahren und Überprüfung der Anreicherung mittels mikroskopischer Präparate wurde das gewonnene Zellmaterial entweder sofort zur Herstellung der Immunogene eingesetzt (3.3.1.3) oder bis zur späteren Verwendung als Beschichtungsantigen für die indirekten Enzymimmuntests (3.2.1.1) bei -20 °C gelagert.

B. cereus Sporen

Zur Sporenanzucht wurden die *B. cereus*-Stämme DSM 4384, DSM 4312 und MHI M1 herangezogen. Bei den beiden erstgenannten Keimen handelt es sich um toxinbildende, gut etablierte Referenzstämme, beim Letzteren um ein Isolat aus einer Gewürzmischung, das im Rahmen der Routinediagnostik des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch isoliert worden war und sich durch eine sehr hohe Sporulierungsrate auszeichnet.

In Vorversuchen wurden mehrere, in der Literatur beschriebene, flüssige Mangelmedien (Embrapa, Sporulationsmedium nach STEWART et al. (1981), Sporulation G) auf ihre die Sporulierung unterstützenden Eigenschaften getestet. Nach Anreicherung der o.a. Stämme konnten jedoch bei allen überprüften Medien im Kulturmaterial sowohl lichtmikroskopisch als auch kulturell – hierfür wurden vorher die vegetativen Formen durch Erhitzung auf 80 °C für 10 min abgetötet – nur geringe Sporenkonzentrationen (< 5 % der Gesamtkeimzahl) nachgewiesen werden, so dass für die weiteren Versuche das im Folgenden beschriebene Verfahren eingesetzt wurde.

Zur Gewinnung der Sporen wurden feste Nährmedien eingesetzt. Dafür wurde Koloniematerial der auf Columbia Agarplatten mit Schafblut angezüchteten Stämme in 1 ml A. dest. suspendiert und anschließend auf Polymyxin-Pyruvat-Eigelb-Mannitol-Bromthymolblau-Agarplatten (PEMBA) ausgespatelt. Die beimpften Platten wurden dann bei 37 °C für 24 h im Brutschrank inkubiert und anschließend zur Anregung der Sporenbildung für 2-3 Tage bei 4 °C gelagert. Danach wurde das Keimmaterial mit 1 %iger (g/v)

Mangansulfatlösung (2 ml pro Petrischale) abgeschwemmt, zentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C), erneut in 1 %iger Mangansulfatlösung resuspendiert und dann für weitere 2-3 Tage bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden die Ansätze mit A. dest. gewaschen. Nach Bestimmung der Keimzahl und lichtmikroskopischer Überprüfung der Reinheit der Sporenpräparation wurde das gewonnene Material zur Herstellung der Immunogene eingesetzt oder bis zur Verwendung für andere Zwecke (Enzymimmuntests, Immunfluoreszenz etc.) bei 4 °C gelagert.

3.3.1.2.2 *Staphylococcus aureus*

Zur Gewinnung von Keimmaterial wurden die *Staphylococcus aureus*-Stämme DSM 20372, DSM 20491, MHI 379 und MHI 409 verwendet. Der Stamm DSM 20372 ist ein Protein-A positiver Referenzstamm, während der Stamm DSM 20491 kein, oder nur sehr wenig Protein-A produziert. Da Protein-A die Eigenschaft hat, unspezifisch an die konstante Region (Fc-Teil, fragment crystalline) von Antikörpern zu binden, wurde Wert darauf gelegt, sowohl positive als auch einen Protein-A negativen Stamm im Versuchsaufbau zu verwenden. Die beiden letztgenannten Stämme wurden im Rahmen der Routinediagnostik des Lehrstuhls aus Milch bzw. Kolostrum isoliert.

Zur Anreicherung der Stämme wurde Koloniematerial der auf Columbia Agarplatten mit Schafblut angezüchteten Staphylokokken in 50 ml TSB verbracht und für 24 h bei 37 °C im Schüttelwasserbad bei 60 Upm inkubiert. Das Keimmaterial wurde dann abzentrifugiert (4000 x g, 4 °C, 10 min), dreimal mit jeweils 20 ml sterilem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS aufgenommen.

3.3.1.3 Inaktivierungsverfahren

3.3.1.3.1 Verwendung von Paraformaldehyd

Mit Vernetzungsmitteln wie Paraformaldehyd (PFA) und Glutaraldehyd inaktivierte Keimpräparationen werden erfolgreich seit vielen Jahren zur Gewinnung spezifischer Antiseren gegen eine Vielzahl verschiedener Bakterienspezies eingesetzt. Da konzentrationsabhängig durch den Einsatz von PFA allerdings immunogene

Oberflächenstrukturen, insbesondere Membranproteine, verändert bzw. irreversibel denaturiert werden, wurde zunächst im Rahmen der eigenen Untersuchungen ermittelt, welche Minimalkonzentrationen an PFA zu einer vollständigen Inaktivierung der Keime (*S. aureus* bzw. *B. cereus*) führen. Dazu wurden die jeweiligen Keime abzentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C), anschließend in unterschiedlich konzentrierten PFA-Lösungen (in PBS) aufgenommen und 24 h bei 4 °C leicht schwenkend inkubiert. Die getesteten PFA-Konzentrationen lagen bei *B. cereus*-Sporen im Bereich von 1 % bis 5 % (g/v) und bei *S. aureus* bei 0,05 % bis 3 % (g/v). Danach wurden die Ansätze zur Entfernung des Vernetzungsmittels mit sterilem PBS (2 x 5 ml) gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Von diesen Präparaten wurden dann Kontrollausstriche auf Columbia Agarplatten mit Schafblut angefertigt, 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend das Wachstum beurteilt. Bei den Bazillen führten PFA-Konzentrationen ab 2 % PFA zu einer vollständigen Inaktivierung, bei *S. aureus* erwiesen sich 0,3 % PFA als ausreichend.

Zur Inaktivierung mittels PFA wurden die in 3.3.1.2.1 (vegetative *B. cereus* Keime bzw. Sporen) bzw. 3.3.1.2.2 (*S. aureus*) beschriebenen Keimpräparationen eingesetzt. Dazu wurde ein Aliquot der Keime bei 10.000 x g abzentrifugiert und in 2 %ige (g/v) (*B. cereus*) bzw. 0,3 %ige (g/v) (*S. aureus*) frisch angesetzte Paraformaldehydlösung aufgenommen. Die Keimgehalte lagen hierbei im Bereich von 10^8 - 10^9 KbE/ml bei den *B. cereus* vegetativen Formen, 10^9 - 10^{10} KbE/ml bei den *B. cereus* Sporen bzw. 10^{10} - 10^{11} KbE/ml bei den *S. aureus* Keimen. Die Ansätze wurden dann für 24 h auf einem Intellimixer bei 4 °C, einem Schwenkradius von 90° und einer Geschwindigkeit von 12 inkubiert.

3.3.1.3.2 Lysostaphin-Aufschluss

Um die in 3.3.1.3.1 skizzierten Nachteile einer PFA-Inaktivierung im Hinblick auf die Generierung von Antikörpern gegen labile Oberflächenstrukturen zu vermeiden, wurde bei Staphylokokken ein alternatives Verfahren zur Gewinnung der Immunogene eingesetzt. Lysostaphin, eine von *Staphylococcus staphylolyticus* produzierte Metalloendoproteinase, führt zur Lyse von Staphylokokken, Zellwand-Trümmer der Keime können als sogenannte „Ghosts“ mittels Zentrifugation gewonnen werden. Zusätzlich zu den Ghosts können auch die Proteine, die während des Lysostaphinaufschlusses in Lösung gehen, als Immunogene verwendet werden, wobei es sich hierbei um eine Mischung aus ursprünglich intrazellulär vorliegenden und Oberflächen-Proteinen handelt.

In einer Reihe von Vorversuchen wurde der Aufschluss optimiert. Es wurden verschiedene Konzentrationen von Lysostaphin, unterschiedliche Inkubationszeiten, Einflüsse von EDTA, DNase und RNase-Zusatz und unterschiedliche Ausgangskeimzahlen getestet. RNase, DNase und die $MgCl_2$ -Lösung, die für die DNase-Funktion nötig ist, verhinderten die Gelbildung verursacht durch die während des Staphylokokkenzerfalls freiwerdenden Nukleinsäuren. Die Proteaseinhibitoren verhinderten, dass die aus den Lysosomen stammenden, bakterienzelleigenen Enzyme die Proteine angreifen und so deren Antigen-Eigenschaften verändern. Um Lysostaphin, eine Metalloendoproteinas, nicht zu inaktivieren, wurde darauf geachtet, Proteaseinhibitoren ohne EDTA-Zusätze einzusetzen. Zur Herstellung der Immunogene wurde das im Folgenden beschriebene optimierte Verfahren eingesetzt.

Zum Lysostaphin-Aufschluss wurde die Keimzahl der Ansätze auf ca. 10^8 KbE/ml eingestellt. Danach wurden pro ml des Ansatzes (in PBS) 20 μg Lysostaphin, 4 μg RNase, 30 μg DNase, 10 μl einer 1 molaren $MgCl_2$ -Lösung und 150 μl Complete Mini ohne EDTA, eine Proteaseinhibitoren-Mischung (7 x konzentrierte Stammlösung), zugefügt. Diese Mischung wurde für 2 h bei 37 °C schwenkend inkubiert. Die entstandenen leeren Zellwandhüllen, die sog. Ghosts, wurden dann mittels Zentrifugation (14.000 x g, 30 min, 4 °C) von den in Lösung gegangenen restlichen Bestandteilen der Staphylokokken getrennt und wieder in PBS aufgenommen. Sowohl die nach der Zentrifugation gewonnenen proteinhaltigen Überstände als auch die Ghosts wurden mittels Ausstrichen auf Blut-Agarplatten auf Sterilität überprüft.

In den Überständen konnte mittels SDS-PAGE eine breite Palette von *S. aureus* Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht nachgewiesen werden (Abb. 1). Deswegen wurden auch mit diesem Material Mäuse immunisiert, zur Quantifizierung wurde der Proteingehalt der Überstände mittels Bradford-Verfahren bestimmt.

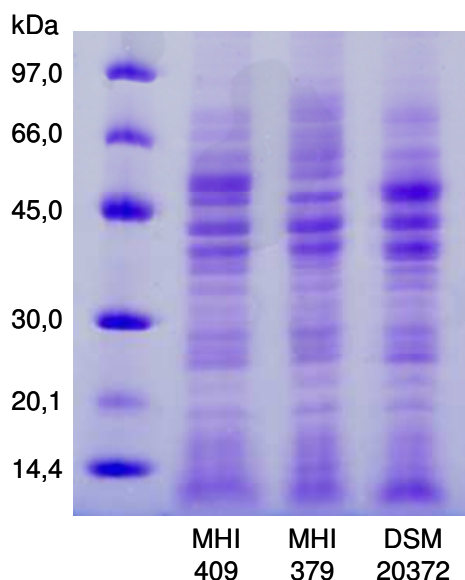


Abbildung 1:

SDS-PAGE von proteinhaltigen Überständen, die nach Lysostaphin-Aufschluss verschiedener Staphylokokken-Isolate gewonnen wurden. Die Färbung der Gele erfolgte mittels Coomassie.

3.3.1.4 Charakteristika der hergestellten Immunogen-Präparationen

Im Hinblick auf hohe Diversität innerhalb der Species *S. aureus* und *B. cereus* wurde zur Präparation der Immunogene jeweils eine Mischung verschiedener Stämme unterschiedlicher Herkunft mit zum Teil bekannten Unterschieden in der Expression von Oberflächenstrukturen, z.B. Produktion von Protein-A, eingesetzt (Tab 1). Bei allen Immunogenen wurde des Weiteren die Sterilität vor Applikation überprüft, um eine Infektion bei den Versuchstieren zu vermeiden. Da die Immunogene jeweils frisch hergestellt wurden, wurde bei fehlender Sterilität von Teilpräparationen die Zusammensetzung des Immunogens modifiziert. Bei den pro Tier applizierten Keimmengen dienten Angaben in der Fachliteratur zur Orientierung. Insgesamt wurden für die Immunisierungen eine Vielzahl unterschiedlicher Präparationen produziert, eine Übersicht über die Präparationen, die tatsächlich zum Einsatz kamen, geben die Tabellen 2-5.

3.3.1.4.1 Inaktivierte Keim-Präparationen

Die Inaktivierung der Sporen und vegetativen Formen von *B. cereus* mittels PFA-Lösung (2 %; g/v) erwies sich als sehr effizient und reproduzierbar. In keinem Fall war es nötig, einen Stamm aufgrund zu vielen noch lebensfähigen Keimen nicht mit in die Injektionsmischung aufzunehmen. Details sind in den Tab. 2 und 3 zusammengefasst.

Tabelle 2: Kenndaten zu den als Immunogen verwendeten *B. cereus* Sporen-Präparationen

Woche	Verwendete Stämme	Keimzahl vor Inaktivierung in KbE/ml	Keimzahl nach Inaktivierung in KbE/ml	Pro Tier applizierte KbE
0		$1,5 \times 10^8$	$< 1 \times 10^3$	1×10^6
8		$2,0 \times 10^9$	$< 3 \times 10^3$	3×10^6
16		$1,1 \times 10^{10}$	steril	1×10^7
23	DSM 4384	$1,3 \times 10^{10}$	steril	2×10^7
28	DSM 4312	$1,6 \times 10^9$	< 500	2×10^7
34	MHI M1	$1,6 \times 10^9$	< 500	2×10^7
42		$1,1 \times 10^{10}$	steril	2×10^7
48		$1,6 \times 10^{10}$	steril	2×10^7

Tabelle 3: Kenndaten zu den als Immunogen verwendeten Präparationen von vegetativen *B. cereus*

Woche	Verwendete Stämme	Keimzahl vor Inaktivierung in KbE/ml	Keimzahl nach Inaktivierung in KbE/ml	Pro Tier applizierte KbE
0		$1,0 \times 10^8$	steril	5×10^6
12		$3,4 \times 10^8$	steril	3×10^7
22	DSM 4384	$7,7 \times 10^8$	steril	5×10^7
29	DSM 31	$4,3 \times 10^8$	steril	8×10^7
40		$5,4 \times 10^9$	steril	5×10^7
45		$1,2 \times 10^{10}$	steril	7×10^7

Prinzipiell konnten bei der Inaktivierung der Staphylokokken deutlich niedrigere PFA-Konzentrationen als bei *B. cereus* verwendet werden. Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich, dass mit dem ursprünglich verwendeten Immunogen (inaktiviert mit 0,5 % (g/v) PFA) bei den immunisierten Mäusen nur vergleichsweise geringe Antikörpertiter gegen "native" *S. aureus* induziert werden konnten. Deswegen wurde in den weiteren Versuchen zum einen die PFA-Konzentration auf 0,3 % (g/v) reduziert, um so antigene Oberflächenstrukturen besser zu konservieren, und zum anderen wurde nur mehr der Protein-A negative *S. aureus*-Stamm DSM 20491 eingesetzt, um so eine durch Protein-A gestörte Antikörper-Produktion bei den Mäusen zu vermeiden. Details sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Kenndaten zu den als Immunogen verwendeten *S. aureus* PFA-Präparationen

Woche	Verwendete Stämme	Keimzahl vor Inaktivierung in KbE/ml	Keimzahl nach Inaktivierung in KbE/ml	Pro Tier applizierte KbE
0	DSM 20372 DSM 20491 MHI 379 MHI 409	$9,9 \times 10^{10}$	< 100	3×10^7
15		$5,0 \times 10^{10}$	steril	5×10^7
28		$1,6 \times 10^{10}$	steril	5×10^7
33	DSM 20491	$1,2 \times 10^{11}$	steril	1×10^8
39		$1,2 \times 10^{11}$	steril	1×10^8
45		$1,2 \times 10^{11}$	steril	1×10^8

3.3.1.4.2 *S. aureus* Protein-Präparationen

Ein kritischer Punkt bei der Inaktivierung der Staphylokokken mittels Lysostaphin-Aufschluss stellte die Keimkonzentration im Ansatz dar. Da genaue Daten hierzu zum Zeitpunkt des Aufschlusses nicht zur Verfügung standen (es wurden nur frische Anreicherungen zu diesem Zweck eingesetzt), waren teilweise in den aufgeschlossenen Proben noch zu viele wachstumsfähige Keime enthalten. Dementsprechend musste die Komposition der Immungen-Präparationen jeweils angepasst werden. Bedingt durch den bei der Ghost-Herstellung benötigten Zentrifugationsschritt bei vergleichsweise hohen g-Zahlen, waren in der Regel die parallel gewonnenen proteinhaltigen Überstände keimfrei oder nur sehr gering belastet und konnten so zur Immunisierung eingesetzt werden. Dies erklärt die in Tab. 5 aufgeführten Unterschiede der Stamm-Zusammensetzung bei den Lysostaphin-Überständen im Vergleich zu den Ghosts. Details sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Kenndaten zu den als Immunogen verwendeten *S. aureus* Lysostaphin-Präparationen

Woche	Verwendete Stämme	Keimzahl vor Inaktivierung in KbE/ml	Keimzahl nach Inaktivierung in KbE/ml	Pro Tier applizierte Proteinmenge bzw. KbE
Lysostaphin-Überstände				
0	DSM 20372	$4,6 \times 10^9$	steril	80 µg
11	MHI 379 MHI 409	$7,5 \times 10^9$	< 800	70 µg
22	DSM 20372 DSM 20491	$4,7 \times 10^9$	steril	30 µg
27	MHI 379 MHI 409	6×10^9	steril	75 µg
Ghost-Präparationen				
0	DSM 20372 MHI 379 MHI 409	$4,6 \times 10^9$	< 800	5×10^8 KbE
11	MHI 379 MHI 409	$7,5 \times 10^9$	< $1,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^8$ KbE
18	DSM 20372 DSM 20491 MHI 379 MHI 409	$2,9 \times 10^9$	< 200	5×10^8 KbE

3.3.2 Herstellung von Antigen-Präparationen

Neben lebenden bzw. mit PFA inaktivierten *B. cereus* und *S. aureus* wurden als Beschichtungsantigene für die jeweiligen EIAs weitere Präparationen hergestellt, um bereits in einem frühen Stadium der Arbeiten ein umfangreiches Bild zur Reaktivität der in den Antiseren bzw. ZKÜs nachweisbaren spezifischen Antikörper zu erhalten.

Eine Übersicht zu den Beschichtungsantigenen, die bei den indirekten EIA-Varianten zur Charakterisierung der Antiseren und mAk eingesetzt wurden, gibt Tab. 6.

Tabelle 6: Verwendete Beschichtungsantigene zur Durchführung der indirekten Enzymimmuntests zum Nachweis von *B. cereus* bzw. *S. aureus*

Nachweis von	Beschichtungsantigen	Konzentration
<i>B. cereus</i> vegetative Keime	Lebende Keime	10^6 - 10^7 KbE/ml
	PFA-inaktivierte Keime	10^6 - 10^7 KbE/ml
	Protein-Extrakt (NaOH)	2 µg/ml
	Protein-Extrakt (Ribolysat)	10^6 - 10^7 KbE/ml
<i>B. cereus</i> Sporen	Lebende Sporen	10^6 - 10^7 KbE/ml
	PFA-inaktivierte Sporen	10^6 - 10^7 KbE/ml
	Protein-Extrakt (NaOH)	2 µg/ml
	Protein-Extrakt (Ribolysat)	10^6 - 10^7 KbE/ml
<i>S. aureus</i>	Lebende Keime	10^8 - 10^9 KbE/ml
	PFA-inaktivierte Keime	10^8 - 10^9 KbE/ml
	Lysostaphin-Überstände	2 µg/ml
	Protein-Extrakt (Ribolysat)	10^8 - 10^9 KbE/ml
	inaktiviertes Protein-A	10 ng/ml

3.3.2.1 *B. cereus* Präparationen

Vegetative Formen

Zuerst wurde Koloniematerial der auch für die Immunisierung eingesetzten Stämme in 150 ml TSB für 24 Stunden bei 32 °C angereichert (Details siehe 3.3.1.2.1). Diese Anzuchten wurden dann bei 5.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, und das Pellet mit 50 ml kaltem PBS gewaschen.

Zur Gewinnung von Oberflächen-Proteinen wurde eine Extraktion mit Natronlauge nach SANCHEZ et al. (2009) durchgeführt. Hierzu wurde das Pellet in 10 ml 0,01 mol/l NaOH unter Zusatz von Proteaseinhibitoren aufgenommen und 1 h bei 4 °C im Intellimixer bei einer Geschwindigkeit von 12 und einem Schwenkwinkel von 90° inkubiert. Daraufhin wurde wieder zentrifugiert, der Überstand mit den gelösten Proteinen abgenommen und deren Konzentration mittels Bradford-Verfahren quantifiziert. Für bestimmte Fragestellungen wurde der Extrakt erhitzt (1 h bei 100 °C) bzw. über Nacht mit Proteinase K (100 µg/ml) verdaut.

Zusätzlich wurde auch ein Zellaufschluss mittels Ribolyser durchgeführt. Hierzu wurde das Pellet in 1 ml PBS mit Zusatz von Proteaseinhibitoren aufgenommen und in ein eisgekühltes Lysing Matrix B-Röhrchen überführt. Dieses wurde dann zweimal 30 Sekunden lang auf Stufe 6 ribolysiert. Dazwischen und danach wurde die Probe auf Eis gekühlt, um eine übermäßige Denaturierung der Probenbestandteile durch die beim Ribolysieren auftretende Wärmeentwicklung zu vermeiden. Das Röhrchen wurde nachfolgend für 15 s bei 1000 x g zentrifugiert, um die Silikakügelchen abzusedimentieren, und abschließend wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen.

B. cereus Sporen

Die Anzucht der Sporen erfolgte wie bereits unter 3.3.1.2.1 beschrieben. Die in 1 ml A. dest. vorliegenden Sporensuspensionen wurden analog zu den oben beschriebenen Verfahren entweder mit 0,01 mol/l NaOH (ca. 5×10^9 KbE in 1 ml) extrahiert oder es erfolgte ein Zellaufschluss im Ribolyser (40 sec auf Stufe 6).

3.3.2.2 S. aureus Protein-Präparationen

Für *S. aureus* wurden sowohl die proteinhaltigen Überstände der Lysostaphin-Aufschlüsse (s. 3.3.1.3.2), als auch Ribolysate als Beschichtungsantigene verwendet.

Um Ribolysate herzustellen, wurden Anzuchten wie unter 3.3.1.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Keimsuspensionen wurden wie unter 3.3.2.1 für die vegetativen Formen von *B. cereus* beschrieben in ein Lysing Matrix B-Röhrchen (MP Biomedicals) überführt und weiterbehandelt.

3.3.2.3 Inaktivierung von Protein-A

Da das in der Zellwand verankerte Protein-A von *S. aureus* in der Lage ist, unspezifisch an die konstante Region (Fc-Teil, fragment crystalline) von Antikörpern zu binden, resultiert die Verwendung von Protein-A-haltigen Präparationen in immunchemischen Verfahren (EIA, Immunoblot etc.) in unspezifischen Signalen. Damit ist es nicht nur schwierig, spezifische Bindungen der Antikörper an andere in Protein-A-haltigen Präparationen enthaltenen Antigene nachzuweisen, sondern auch der Nachweis von Antikörpern gegen Protein-A selbst, das einen wichtigen Bestandteil der Zellwand von *S. aureus* darstellt. Um diese Problematik zu umgehen, wurde Protein-A inaktiviert, indem die funktionellen Tyrosinreste des Protein-A mit Tetranitromethan modifiziert wurden (SOKOLOVSKY et al., 1966; SJÖHOLM et al., 1973).

Dafür wurden 600 µg Protein-A (gelöst in 0,3 ml PBS) unter Rühren mit 6 µl Tetranitromethanolösung (0,15 mol/l in 95 %igem Ethanol) versetzt. Diese Mischung wurde dann bei Raumtemperatur unter Rühren eine Stunde lang inkubiert. Danach wurde der Ansatz über eine mit 25 ml PBS äquilibrierte PD-10 Säule gegeben und der Durchlauf in 0,5 ml-Fractionen aufgefangen, wobei das inaktivierte Protein-A in den gelb gefärbten Fractionen enthalten war. Im Spektrum dieser Fractionen war ein zusätzlicher Peak bei 424 nm zu sehen.

Das so hergestellte, inaktivierte Protein-A wurde in EIA-Verfahren getestet. Die unspezifische Bindungsaktivität an Antikörper war im Vergleich zu nativem Protein-A deutlich reduziert (Abb. 2), bei geringen Beschichtungskonzentrationen (≤ 10 ng/ml) war keine den EIA störende Protein-A Reaktivität mehr nachweisbar.

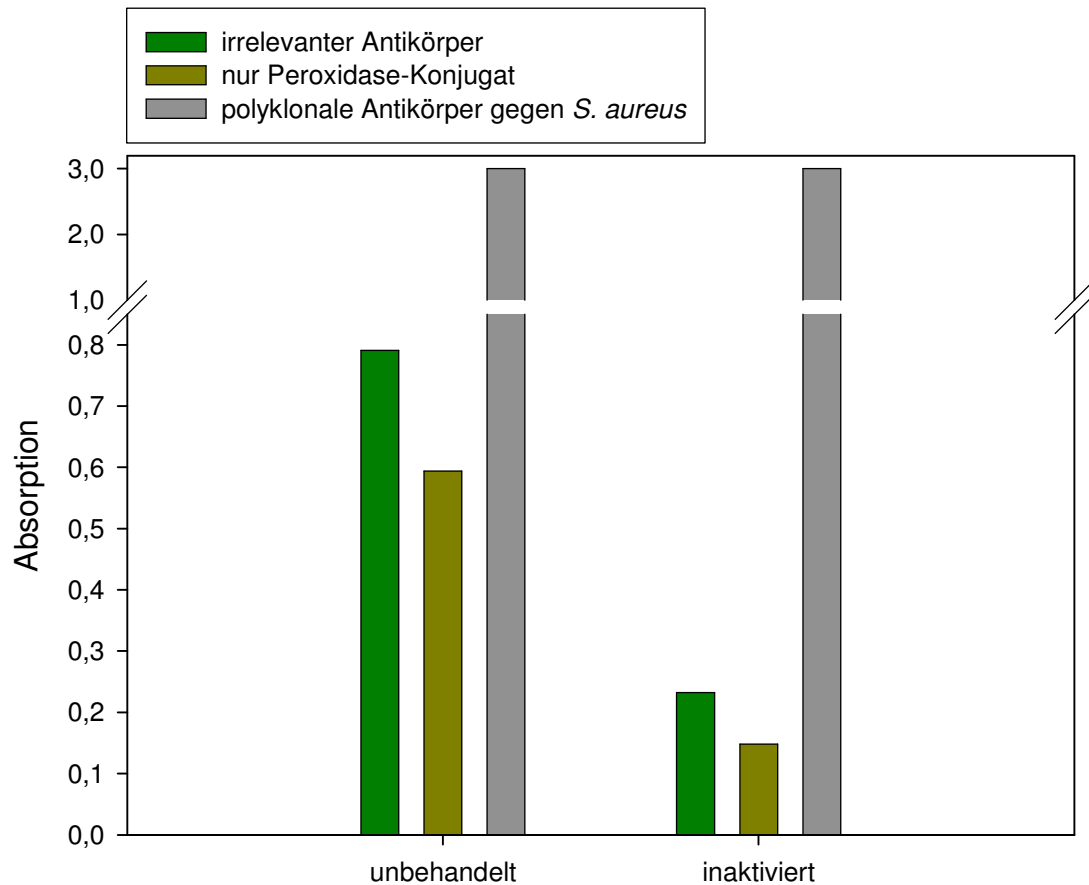


Abbildung 2: Reaktivität von unbehandeltem und inaktiviertem Protein-A (75 ng/ml) mit irrelevanten und spezifischen Antikörpern im indirekten EIA. Die unspezifische Reaktion der Antikörper mit inaktiviertem Protein-A ist deutlich reduziert, während die spezifische Reaktion von gegen Protein-A gerichteten Antikörpern erhalten bleibt.

3.3.3 Immunisierung

Zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen *B. cereus* (vegetative Keime und Sporen) und *S. aureus* wurden unter Verwendung der in 3.3.1 beschriebenen Immunogene 30 weibliche Mäuse (Zuchtlinien BALB/c bzw. Hybridlinie BALB/c x (NZW x NZB)) in Gruppen von je 5 Tieren immunisiert. Hierbei wurden zur Gewinnung von Antikörpern gegen *B. cereus* Sporen zwei alternative Immunisierungsschemata (Tab. 7) eingesetzt: Zum einen wurde den Tieren entsprechend den üblichen Verfahren eine Emulsion aus Immunogen und Adjuvans (Freundsches Adjuvans, FA) verabreicht, zum anderen wurden den Mäusen Sporen ohne Adjuvans-Zusatz subkutan appliziert. Tiere, bei denen hohe Antikörper-Titer, sowie eine hohe apparente Affinität der gewonnenen Antiseren (3.3.4.1)

unter Verwendung von Enzymimmuntests (EIAs) festgestellt werden konnte, wurden für die Herstellung von mAk mittels Zellfusion selektiert.

Tabelle 7: Übersicht zur Immunisierung von Mäusen mit *B. cereus* Sporen bzw. vegetativen Formen

Aktion	<i>B. cereus</i> Sporen I	<i>B. cereus</i> Sporen II	<i>B. cereus</i> vegetative Formen
Grundimmunisierung	1 x 10 ⁶ KbE in PBS s.c.	1 x 10 ⁶ KbE in FA i.p.	5 x 10 ⁶ KbE in FA i.p.
1. Restimulierung	3 x 10 ⁶ KbE in PBS s.c.	1 x 10 ⁷ KbE in FA i.p.	3 x 10 ⁷ KbE in FA i.p.
Fusionen	-	Mäuse II & IV	-
2. Restimulierung	1 x 10 ⁷ KbE in PBS s.c.	2 x 10 ⁷ KbE in FA s.c.	5 x 10 ⁷ KbE in FA i.p.
Fusionen	Maus I	Mäuse III & V	Mäuse III & IV
3. Restimulierung	2 x 10 ⁷ KbE in PBS s.c.	Versuchsende	5 x 10 ⁷ KbE in FA s.c.
Fusionen	Maus III		Maus I
4. Restimulierung	2 x 10 ⁷ KbE in PBS s.c.		Versuchsende
Fusionen	Maus IV & V		
	Versuchsende		

Da im Hinblick auf die Herstellung von mAk gegen *S. aureus* in einer ersten Versuchsreihe der Einsatz der mittels Lysostaphin gewonnenen Ghosts nur beschränkt erfolgreich war, wurde daneben auch ein alternatives Immunogen (mittels PFA inaktivierte Keime) hergestellt und zur Immunisierung eingesetzt (Tab. 8).

Tabelle 8: Übersicht zur Immunisierung von Mäusen mit Paraformaldehyd-inaktivierten *S. aureus* Keimen bzw. *S. aureus* Protein-Präparationen

Aktion	<i>S. aureus</i> Proteine	<i>S. aureus</i> Ghosts	<i>S. aureus</i> PFA
Grundimmunisierung	80 µg Protein in FA i.p.	5 x 10 ⁸ KbE in FA i.p.	3 x 10 ⁷ KbE in FA i.p.
1. Restimulierung	70 µg Protein in FA i.p.	2,5 x 10 ⁸ KbE in FA i.p.	5 x 10 ⁷ KbE in FA i.p.
Fusionen	-	Mäuse III & IV	-
2. Restimulierung	30 µg Protein in FA s.c.	Versuchsende	5 x 10 ⁷ KbE in FA s.c.
Fusionen	Mäuse II & III		Mäuse IV & V
3. Restimulierung	Versuchsende		1 x 10 ⁸ KbE in FA s.c.
Fusionen			Maus III
			Versuchsende

Zur Herstellung von polyklonalen Seren wurden inaktivierte Mischungen der *S. aureus* Stämme DSM 20372, MHI 379, MHI 409, DSM 20491 und Sporenpräparationen der *B. cereus* Stämme DSM 4384, DSM 4312 und MHI M1 lyophilisiert. In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Milchwissenschaften in Gießen (Prof. Dr. Usleber, Justus-Liebig-Universität Gießen) wurden damit drei weibliche Chinchilla-Bastard-Kaninchen (Herkunft: Charles River) immunisiert. Eine Übersicht über die Immunisierungen gibt Tab. 9.

Tabelle 9: Gewinnung von polyklonalen Kaninchen-Antiseren gegen *S. aureus* und *B. cereus* Sporen

	Tiere #71 & #75	Tier #74
Grund-immunisierung	Woche 0	Woche 0
Restimulierung	Woche 10	Woche 19
Immunogene	<i>Staphylococcus aureus</i> Stämme DSM 20372, MHI 379, MHI 409, DSM 20491	<i>Bacillus cereus</i> -Sporen Stämme DSM 4384, DSM 4312, MHI M1
Inaktivierung	0,5 % PFA (g/v)	2 % PFA (g/v)
KbE/Tier	$1,7 \times 10^{10}$	$8,7 \times 10^8$
Adjuvans	FA	FA
Injektionsvolumen	2 ml	2 ml
Applikationsart	s.c.	s.c.

3.3.4 Überprüfung des Immunisierungserfolgs

3.3.4.1 Polyklonale Mäuse-Antiseren

Die polyklonalen Seren, die bei den Blutabnahmen von den Versuchsmäusen gewonnen wurden, wurden wie unter 3.2.1.1 beschrieben untersucht, um ihre Titer als Richtgröße für den Gehalt an spezifischen Antikörpern gegen die verwendeten Antigene zu messen. Zur Bestimmung des Titers wurden bei konstanter Beschichtungsantigen-Konzentration Verdünnungsreihen der Mäuseseren eingesetzt. Als Titer wurde diejenige Verdünnungsstufe definiert, bei der im jeweiligen EIA-System noch eine Absorption von 1,0 erreicht wurde.

Generell entwickelten alle Mäuse signifikante Titer gegen die jeweils eingesetzten Antigene. In den Seren der mit Sporen von *B. cereus* immunisierten Mäuse konnten die höchsten Titer ($> 10^5$) nachgewiesen werden, wobei die Seren der mit Adjuvans immunisierten Mäuse etwas höhere Werte aufwiesen. Bei den vegetativen Formen von *B. cereus* variierten die in den Seren der immunisierten Mäuse nachweisbaren Titer von 1:20.000 bis 1:190.000 (Abb. 3).

Die Seren der mit den Präparationen von *S. aureus* immunisierten Mäuse lagen im Schnitt unter den Werten, die bei *B. cereus* erreicht wurden. Vergleichsweise niedrige Titer wurden insbesondere bei den mit Lysostaphin-Überständen von *S. aureus* immunisierten Mäusen beobachtet (Abb. 3), während die Werte bei den mit *S. aureus*-Ghosts immunisierten Mäusen höher lagen (Titer bis zu 1:70.000). Generell konnten bei den mit PFA-inaktivierten *S. aureus* immunisierten Mäusen deutlich höhere Titer nachgewiesen werden. Die Titer der einzelnen Tiere stiegen nach der zweiten Restimulierung stark an (bis zu Faktor 8), und erreichten Werte von 1:10.000 bis zu >1:70.000.

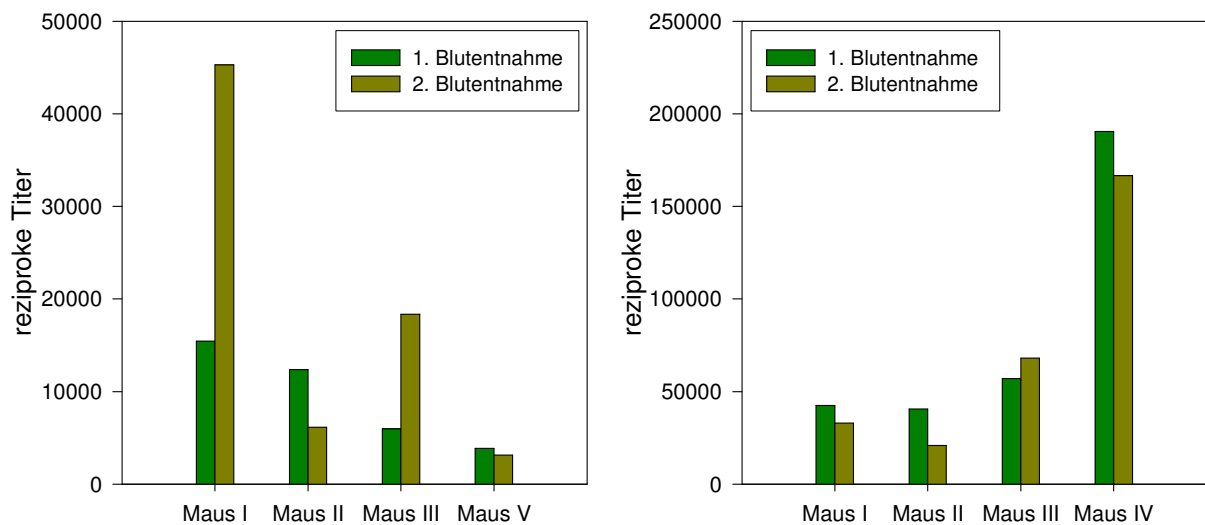


Abbildung 3: Nachweisbare Antikörper-Titer in den Antiseren der mit *S. aureus* Lysostaphin-ÜS immunisierten Mäuse (linke Abbildung) bzw. der mit vegetativen Formen von *B. cereus* immunisierten Tiere (rechte Abbildung).

Die apparente Avidität der polyklonalen Mäuseseren wurde ebenfalls mittels indirekter EIA-Verfahren, wie unter 3.2.1.1 beschrieben, überprüft. Dazu wurden die Mikrotiterplatten mit einer Verdünnungsreihe des Antigens beschichtet, während die Seren in gleichbleibender Konzentration, und damit im Überschuss, dazu gegeben wurden. Je geringer die Konzentration des Antigens war, bei der noch eine deutliche Reaktivität (Extinktion $\geq 1,0$) der Antiseren messbar blieb, desto höher war die Avidität/Affinität der Antikörper für das Antigen.

Die Werte der apparenten Avidität der Seren korrelierten stark mit den Titern. Bei denjenigen Tieren, bei denen nach Restimulierung und erneuter Blutabnahme die Antikörperspiegel gestiegen waren, war auch ein merklicher Anstieg der Avidität zu messen, und umgekehrt. So detektierte das Serum der mit Lysostaphin-Überstand von *S. aureus*

immunisierten Maus I nach der ersten Blutabnahme Antigen-Konzentrationen von 2,5 µg/ml, das Serum der zweiten Blutabnahme reagierte dann schon bis zu einer Konzentration von 625 ng/ml. Die Seren der Mäuse, die mit Ghosts von *S. aureus* immunisiert worden waren, zeigten unter den Bedingungen eines indirekten EIA eine deutlich höhere apparente Avidität. So konnten mit diesen Antiseren noch Antigen-Konzentrationen von weniger als 45 ng/ml nachgewiesen werden. Da es sich beim Beschichtungsantigen um eine breite Mischung verschiedener *S. aureus* Proteine handelte (Abb. 1), liegt die tatsächliche Affinität der gegen Einzelproteine gerichteten Antikörper noch deutlich höher. Die Seren der Mäuse, die mit PFA-inaktivierten *S. aureus* immunisiert worden waren, erlaubten im indirekten EIA den Nachweis von weniger als 5×10^4 Keimen pro ml.

Mit den Seren der mit vegetativen Formen von *B. cereus* immunisierten Mäuse konnten im indirekten EIA Keimgehalte PFA-inaktivierter Bazillen von weniger als 10^4 KbE/ml nachgewiesen werden. Ähnlich reagierten die Seren gegen *B. cereus* Sporen, mit denen ebenfalls im indirekten EIA weniger als 10^4 KbE/ml Lebendsporen bzw. weniger als 19 ng/ml Protein-Extrakt (3.3.2.1) nachgewiesen werden konnten. Hierbei konnten zwischen den beiden Immunisierungsvarianten keine Unterschiede festgestellt werden.

Im Hinblick auf die Eigenschaften der polyklonalen Mäuseseren sind in Tab. 10 beispielhaft einige der bei der Charakterisierung erhaltenen Ergebnisse der indirekten EIAs dargestellt.

Tabelle 10: Reaktivität der polyklonalen Mäuseseren gegen *B. cereus* und *S. aureus* in ausgewählten EIA-Systemen

Immunogen	Beschichtungsantigen im indirekten EIA	Antikörper-Titer	Apparente Avidität
	PFA inaktivierte		
Vegetative Formen von <i>B. cereus</i>	vegetative Formen von <i>B. cereus</i> DSM 31 und 4384	20.800 – 190.500	$5,2 \times 10^3$ – $1,1 \times 10^5$ KbE/ml
Sporen von <i>B. cereus</i> (mit Adjuvans)	NaOH-Extrakt von Sporen der <i>B. cereus</i> Stämme DSM 4384, 4312 und MHI M1	81.000 – 135.000	13,8 ng/ml
Sporen von <i>B. cereus</i> (ohne Adjuvans)	NaOH-Extrakt von Sporen der <i>B. cereus</i> Stämme DSM 4384, 4312 und MHI M1	18.000 – 53.300	19,6 – 179 ng/ml
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> DSM 20491		
Lysostaphin- Überstände	Lysostaphin- Überstand	6.100 – 45.200	120 – 620 ng/ml
<i>S. aureus</i> Ghosts	<i>S. aureus</i> DSM 20491 Lysostaphin- Überstand	28.000 – 70.000	45 ng/ml
PFA-inaktivierte <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> DSM 20491 Ribolysat	9.100 – >70.000	5×10^4 – $3,2 \times 10^6$ KbE/ml

Zur weiteren Charakterisierung der Maus-Antiseren wurde ein Immunoblotverfahren eingesetzt. Bei der Untersuchung der polyklonalen Maus-Antiseren gegen *S. aureus* konnten bei Einsatz der gegen die Lysostaphin-Überstände gerichteten Antikörper im Blot eine im Vergleich zu den Ghost-Antiseren deutlich ausgeprägtere Reaktivität festgestellt werden. Eine Vielzahl von Protein-Banden waren hierbei im Blot sichtbar, während bei Einsatz der gegen die Ghosts generierten Antiseren sich im wesentlichen nur 2 Hauptbanden im Bereich von 30-35 kDa darstellten (Abb. 4). Daneben zeigten alle Seren mit Protein-A positiven *S. aureus* Stämmen eine ausgeprägte Reaktivität im Bereich von 45-66 kDa. Dies war im wesentlichen

auf die antikörperbindenden Eigenschaften des trotz Vorbehandlung mit SDS noch aktiven Protein-A zurückzuführen, da sich auch bei parallel mituntersuchten Vergleichsseren ein ähnliches Bild zeigte (Ergebnisse nicht dargestellt).

Gegen *B. cereus* vegetative Keime bzw. Sporen gerichtete Antiseren reagierten jeweils mit den auch in der SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung sichtbaren 5-6 Hauptbanden der jeweiligen Präparation. Vorversuche belegten auch, dass die Antiseren gegen Sporen bzw. vegetative Keime nicht mit den Membranproteinen von vegetativen *B. cereus* Keimen bzw. Sporen reagierten, so dass mit den hergestellten Seren prinzipiell ein selektiver Nachweis von vegetativen *B. cereus* bzw. Sporen möglich ist (Ergebnisse nicht dargestellt).

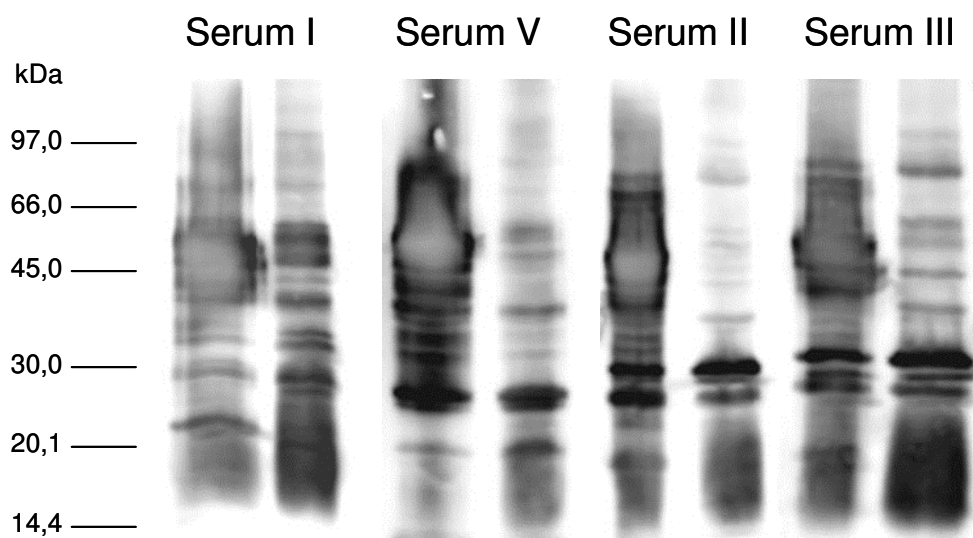


Abbildung 4: Überprüfung von mit unterschiedlichen Immunogenen hergestellten Mäuseseren gegen *S. aureus* mittels Immunoblot. Bei Seren I/V wurde Lysostaphin-Überstand, bei Seren II/III Ghosts als Immunogen verwendet. Dargestellt ist jeweils die Reaktivität der Seren mit dem *S. aureus*-Stamm DSM 20372 (Protein-A positiv; links) und dem Stamm DSM 20491 (Protein-A negativ; rechts)

3.3.4.2 Polyklonale Kaninchen-Antiseren

Die beiden Tiere, die mit *S. aureus* Keimen immunisiert wurden, erreichten im indirekten EIA (Beschichtung: *S. aureus* DSM 20491 Ribolysat mit 1×10^8 KbE/ml) Titer von fast 1:300.000 um die 20. Woche nach der Grundimmunisierung. Kaninchen #75 zeigte hierbei im Versuchsverlauf einen leichten Rückgang der Titer, die Werte von Kaninchen #71 dagegen lagen über den gesamten Versuchszeitraum konstant bei Titern von zumeist über 1:100.000.

Das Kaninchen, das mit *B. cereus*-Sporen immunisiert wurde, erreichte noch höhere Werte von bis zu 1:400.000 (Beschichtung: Lebendsporen der *B. cereus*-Stämme DSM 4384, 4312 und MHI M1 mit 1×10^7 KbE/ml), die nachweisbaren Titer bewegten sich auch 40 Wochen nach der Grundimmunisierung auf anhaltend hohem Niveau. Abb. 5 zeigt exemplarisch einige Titerwerte der Kaninchen im Verlauf.

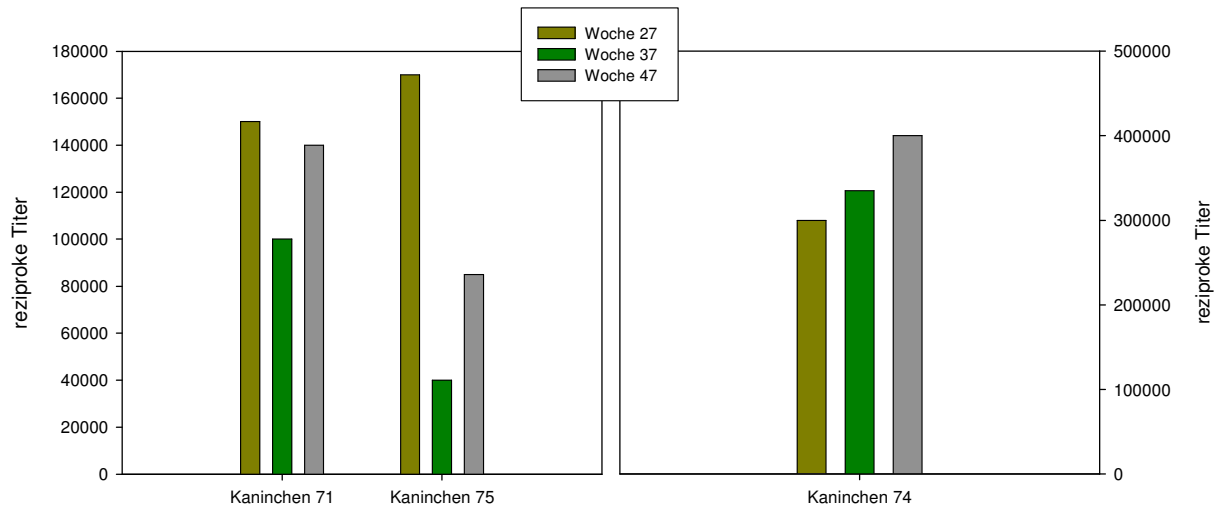


Abbildung 5: Nachweisbare Antikörper-Titer in den Antiseren der mit *S. aureus* immunisierten Kaninchen (#71 & #75) bzw. des mit Sporen von *B. cereus* immunisierten Tieres (#74).

3.3.5 Charakterisierung der Antikörper und Etablierung von Nachweisverfahren

Im Hinblick auf die Etablierung Antikörper-produzierender Zelllinien wurde das aus den Fusionen gewonnene Zellmaterial auf Mikrotiterplatten ausgesät und für 12 d im CO₂-Brutschrank vermehrt. Anschließend wurden die Hybridome unter Verwendung der in 3.2.1.1 beschriebenen indirekten EIAs auf Antikörper-Produktion getestet. Reagierende Zellklone wurden selektiert und vermehrt. Da in den einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatten nicht nur die gewünschten, antikörperproduzierenden Zellen vorhanden sind, sondern auch eine Reihe nichtproduzierender Hybridom-Zellen, die die produzierenden unter Umständen überwuchern können, ist es bei der Etablierung von Hybridomzellen üblich, dass nicht alle reagierenden Klone erfolgreich weiter kultiviert werden können. Zusätzlich kann es passieren, dass zuerst produzierende Zellklone ihre Produktion von Antikörpern nach ein paar Generationen einstellen, weshalb die Zahl an weitergeführten Zelllinien bis zur Etablierung von reaktiven, produzierenden, möglichst stabilen Reinkulturen stetig abnimmt.

Insgesamt wurde eine Vielzahl von Zellfusionsexperimenten durchgeführt, aus der ein breiter Pool monoklonaler Antikörper (mAk) gewonnen werden konnte, die auf ihre Reaktivität und Stabilität selektiert wurden. Eine Übersicht über die Fusionen und die im Laufe des Selektionsprozesses etablierten Zelllinien gibt Tab. 11.

Tabelle 11: Herstellung monoklonaler Antikörper zum Nachweis von *S. aureus* und *B. cereus*: Übersicht über durchgeführte Zellfusionsexperimente, reaktive Klone und etablierte Zelllinien

Keim	Immunogen	Anzahl Fusionen	Reaktive Klone*	Etablierte Zelllinien
<i>B. cereus</i>	Vegetative Formen	3	16	6
	Sporen	8	4	2
<i>S. aureus</i>	Lysostaphin-Überstand	2	8	6
	Ghosts	2	2	2
	Ganze Bakterien	4	13	6

* Antikörperproduzierende Zellen wurden bei -80 °C konserviert

Um die gewonnenen Antikörper umfassend zu charakterisieren und im Hinblick auf die jeweiligen Besonderheiten der Zielkeime, wurden verschiedene EIA-Varianten entwickelt.

3.3.5.1 Monoklonale Antikörper gegen vegetative Formen von *B. cereus*

Die in Tab. 12 zusammengefassten Ergebnisse zur Charakterisierung der mAk gegen vegetative Formen von *B. cereus* zeigen, dass mit den hergestellten Antikörpern die Etablierung eines sensitiven Nachweissystems möglich ist. Alle mAk gehören zum IgG-Subtyp, IgM-Antikörper wurden bei der Etablierung der Hybridome frühzeitig ausgesiekt. Insbesondere die mAk 2C10 und 2E12 zeichnen sich durch eine hohe apparente Affinität aus, alle mAk reagieren mit Oberflächenproteinen der Keime. Die Spezifität und Immunreaktivität der sechs vielversprechendsten Klone wurde mittels EIA und Immunoblot im Detail überprüft. Tab. 12 zeigt eine Übersicht über die etablierten mAk und deren wesentliche Eigenschaften.

Tabelle 12: Monoklonale Antikörper gegen vegetative Formen von *B. cereus*

Klon	Subtyp	Titer der ZKÜ*	Apparente Affinität (KbE)	Molekulargewicht der Zielantigene in kDa
1B3	IgG _{2b}	1:3000	9×10^4	> 150; 52,1; 45,0
1E4	IgG _{2b}	> 1:20000	2×10^5	17,7
2C10	IgG _{2a}	1:10000	4×10^4	15,6
2E12	IgG _{2b}	> 1:20000	2×10^5	15,8
2E3	IgG ₁	1:2500	5×10^4	83,1; 73,5; 57,4
3G2	IgG _{2a}	1:150	$2,5 \times 10^5$	16,2

* ZKÜ = Zellkulturüberstände

3.3.5.1.1 Apparente Affinität

Die apparente Affinität der mAk gegen vegetative Formen von *B. cereus* wurde wie bei den polyklonalen Seren beschrieben (3.3.4.1) überprüft. Die Werte sind in Tab. 12 zusammengefasst, Abb. 6 zeigt die bei der Bestimmung der apparenten Affinität erhaltenen Titrationskurven.

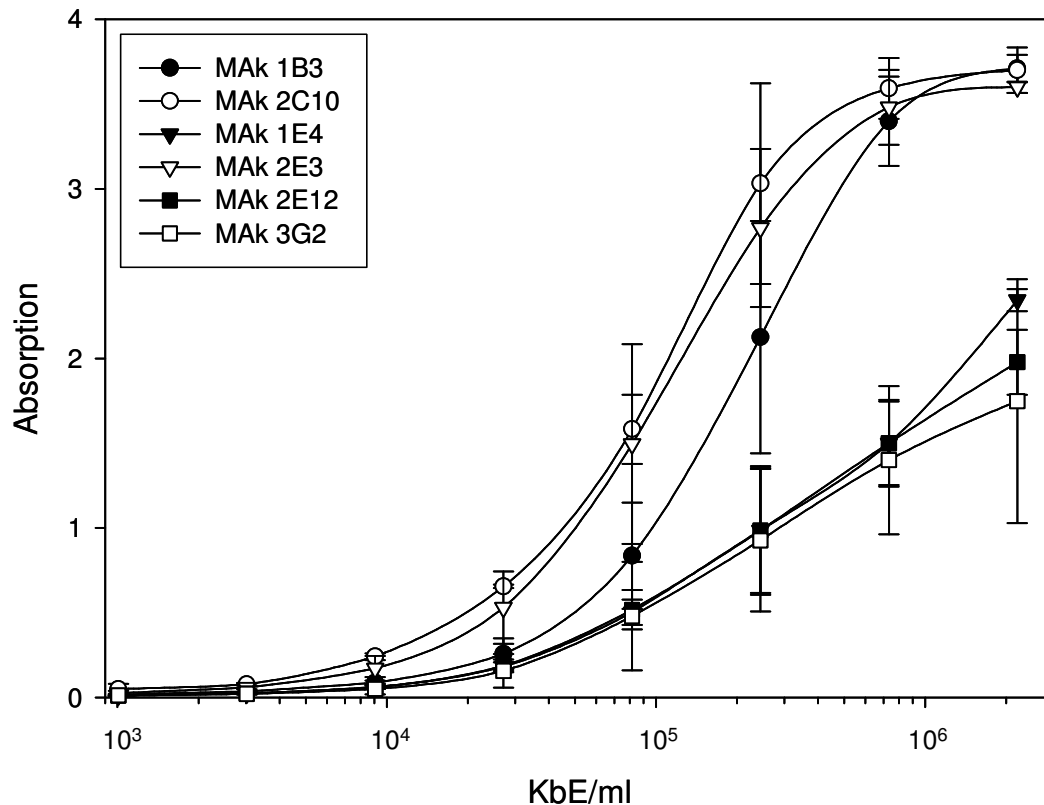


Abbildung 6: Standardkurven der mAk gegen vegetative Formen der Referenzstämme von *B. cereus* im indirekten EIA (Beschichtung mit lebenden Keimen).

3.3.5.1.2 Intra- und Intergenusspezifität

Um die Spezifität der mAk innerhalb des Genus *Bacillus* zu überprüfen, wurde eine Stammbibliothek von insgesamt 107 Stämmen angelegt. Diese beinhaltete 84 Stämme *B. cereus*, 4 Stämme *B. weihenstephanensis*, 3 Stämme *B. mycoides*, sowie 2 Stämme *B. thuringiensis* als Vertreter der Cereus-Gruppe. Außerdem wurden 14 weitere Vertreter des Genus *Bacillus* wie z.B. *B. licheniformis*, *B. subtilis* und *B. coagulans* untersucht. Details zu den Stämmen sind in Tab. A1, A2 und A3 im Anhang aufgeführt. Die Untersuchungen wurden in indirekten EIAs durchgeführt.

Die mAk 1B3, 2C10 und 2E3 (Abb. 7 a-c) zeichneten sich durch eine hohe Affinität und eine breite Reaktivität mit Vertretern der Cereus-Gruppe, insbesondere mit *B. cereus* selbst, aus. Die weniger affinen mAk 1E4, 2E12 und 3G2 (Abb. 7 d-f) zeigten hingegen eine hohe Spezifität für einzelne Vertreter der Spezies *B. cereus* bzw. der Cereus-Gruppe. Somit sind die gewonnenen Antikörper potentiell zum spezifischen immunologischen Nachweis von vegetativen Formen von *B. cereus* geeignet.

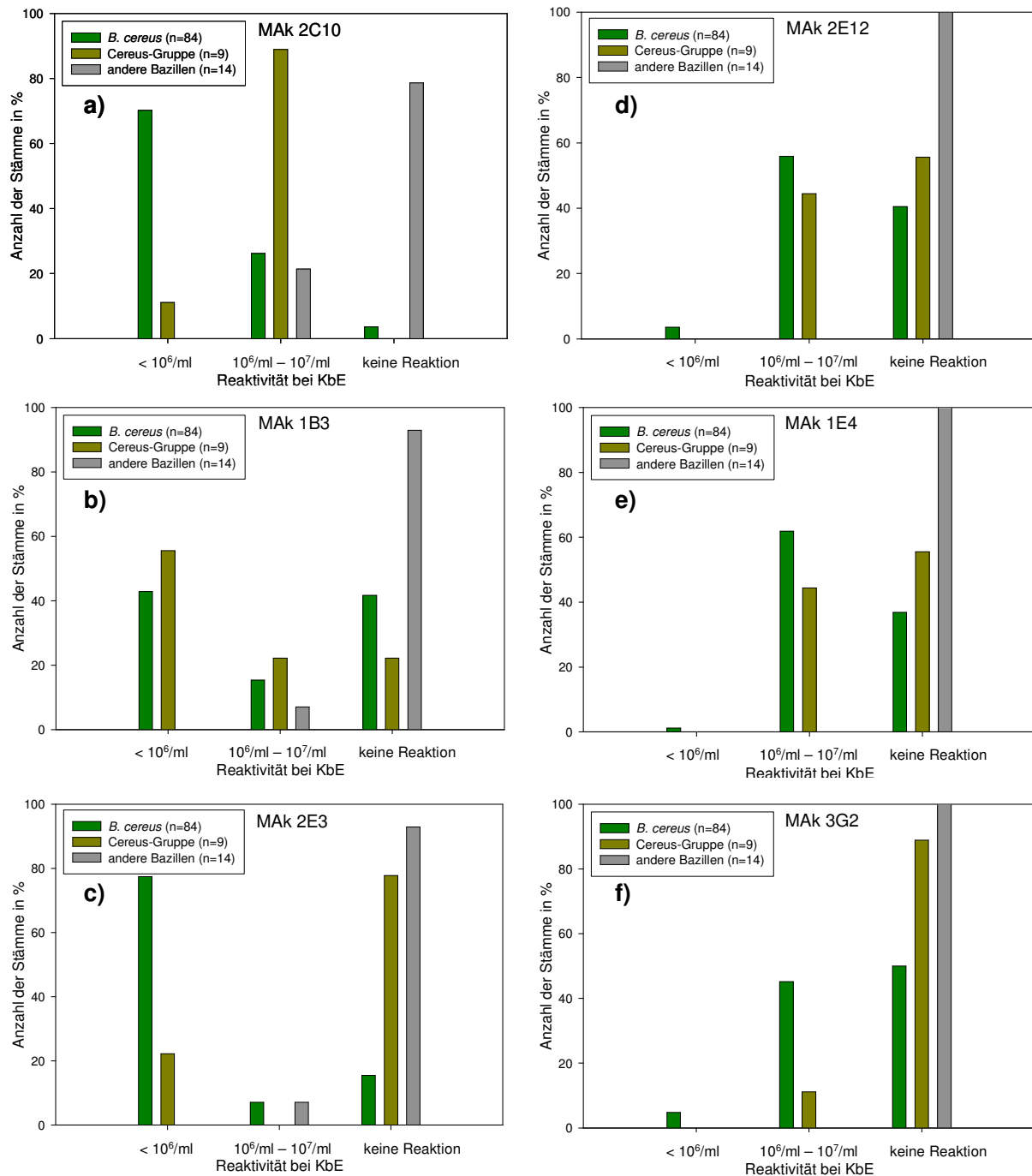


Abbildung 7: Reaktivität der mAk gegen vegetative Formen von *B. cereus*. MAK mit hoher Sensitivität gegenüber *B. cereus* und der Cereus-Gruppe: 2C10, 1B3 und 2E3 (a-c); mAk mit hoher Spezifität für *B. cereus* und die Cereus-Gruppe: 2E12, 1E4 und 3G2 (d-f).

3.3.5.1.3 Immunoblot

Um die mAk genauer zu charakterisieren, wurde der *B. cereus*-Referenzstamm DSM 31 wie in 3.3.2.1 beschrieben mit NaOH-Lösung behandelt und der Überstand mit den in Lösung befindlichen Oberflächenproteinen als Probenmaterial für den Immunoblot (3.2.3) eingesetzt.

Alle sechs mAk reagierten mit der Oberflächenprotein-Präparation. Die relativen Molekulargewichte der Zielantigene (gemessen in Relation zu Eichproteinen) sind in Tab. 12 zusammengefasst. Abb. 8 zeigt das im Immunoblot bei Einsatz der jeweiligen mAk erhaltene Bandenmuster. Weiterführende Untersuchungen, bei denen die Oberflächenprotein-Präparationen erhitzt bzw. mit Proteinase K verdaut wurden, zeigten, dass im indirekten EIA nur noch der mAk 2C10 mit den erhitzten Antigenen reagierte, nach Proteinase K-Verdau reagierten alle mAk negativ.

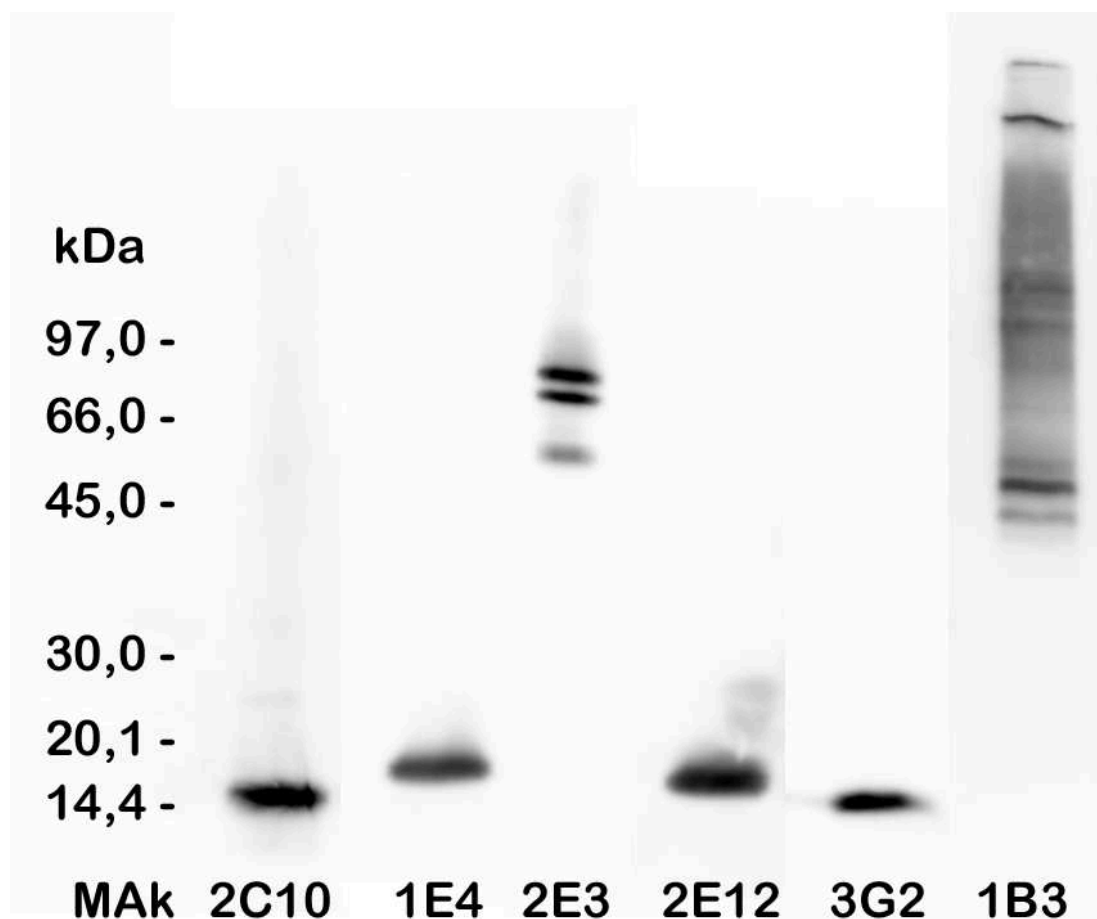


Abbildung 8: Westernblot-Analysen zur Reaktivität der mAk mit Oberflächenproteinen des *B. cereus*-Referenzstammes DSM 31

Die Reaktivität mit den Oberflächenproteinen unterstützt die Annahme, dass die mAk potentiell zum immunologischen Nachweis der Bazillen geeignet sind. Orientierende Versuche, die Bindung der Antikörper auch an lebende Keime in der Immunfluoreszenz nachzuweisen, scheiterten jedoch.

3.3.5.2 Antikörper gegen *B. cereus* Sporen

Trotz der hohen Zahl von insgesamt 8 Zellfusionsexperimenten (Tab. 11) und des Einsatzes von zwei verschiedenen Immunisierungsstrategien erwies es sich als äußerst schwierig, mAk vom IgG-Subtyp gegen Sporen von *B. cereus* zu generieren. Aus den gesamten Zellfusionen konnten nur wenige reaktive, und noch weniger stabile Klone gewonnen werden, so dass nur zwei mAk, 1F12 und 2E7, für detailliertere Untersuchungen zur Verfügung standen. Das polyklonale Kaninchenserum dagegen zeigte sehr vielversprechende Eigenschaften und wurde daher umfassend charakterisiert.

3.3.5.2.1 Sensitivität

3.3.5.2.1.1 Apparente Affinität der monoklonalen Antikörper

Die apparente Affinität der mAk wurde analog zu dem Verfahren, das bei den polyklonalen Seren beschrieben wurde (3.3.4.1), untersucht. Unter den Bedingungen eines indirekten EIAs konnten mit den mAk 1F12 bzw. 2E7 Nachweisgrenzen von $2,1 \times 10^5$ KbE/ml, bzw. $6,9 \times 10^4$ KbE/ml erreicht werden. Abb. 9 zeigt die entsprechenden Standardkurven der indirekten EIAs zum Nachweis von *B. cereus* Sporen. Analog zu den lebenden Sporen wurde auch Sporen-NaOH-Extrakt (3.3.2.1) im indirekten EIA eingesetzt und die apparente Affinität bestimmt. Die bei der Verwendung dieses Beschichtungsantigens erreichten Nachweisgrenzen von 24,7 ng/ml (mAk 2F12), bzw. 0,9 ng/ml (mAk 2E7) verdeutlichten die unterschiedliche Affinität der beiden Antikörper und bestätigten die bei der Untersuchung von lebenden Sporen erzielten Ergebnisse.

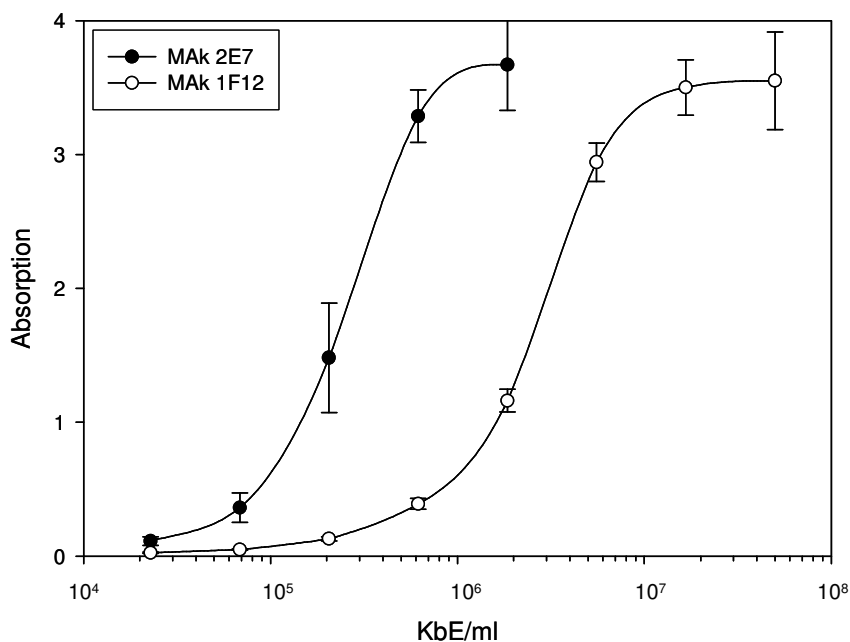


Abbildung 9: Standardkurven der indirekten EIAs zum Nachweis von lebenden *B. cereus* Sporen unter Verwendung der mAk 1F12 bzw. 2E7.

3.3.5.2.1.2 Sandwich-EIA mit polyklonalen Antikörpern und Referenzstämmen

Da sich in orientierenden Vorversuchen unter Verwendung indirekter EIA-Verfahren zeigte, dass das polyklonale Kaninchenserum sich durch eine hohe Avidität und breite Reaktivität auszeichnete, wurde um die einfache und schnelle Detektion von Sporen in wässrigen Lösungen zu ermöglichen ein Sandwich-EIA erstellt. Aufgrund des Assay-Designs nicht-kompetitiver EIA-Verfahren resultiert die Verwendung von Sandwich-EIAs gegenüber indirekten EIA-Systemen in einer Steigerung der Nachweisempfindlichkeit von etwa Faktor 10. Bei Sandwich-EIAs werden Fangantikörper, in diesem Fall polyklonale Kaninchenserum, an die feste Phase gebunden und anschließend mit den Probenlösungen inkubiert. Die an die Fangantikörper gebundenen Antigene werden dann durch enzymmarkierte Detektionsantikörper detektiert. Zur Herstellung des Antikörper-HRP-Konjugates wurde aktivierte Peroxidase und mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung gefälltes, polyklonales Kaninchenserum des Tieres #74 eingesetzt. Dazu wurden 3 mg (in 750 µl) des gegen Kopplungspuffer dialysierten Serums mit 4 mg aktivierter Peroxidase (gelöst in 250 µl A. dest.) versetzt und der pH-Wert mit Natriumcarbonatlösung auf 9 eingestellt. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln und Zugabe von 100 µl Triethanolamin- und 125 µl Natriumborhydridlösung wurde erneut für 30 min bei 4 °C

inkubiert. Dann erfolgte eine weitere Zugabe von 62,5 µl Triethanolaminlösung und ein weiterer Inkubationsschritt bei 4 °C über zwei Stunden. Nach Zugabe von 25 µl Glycinlösung und Dialyse des Ansatzes gegen PBS mit Zusatz von 10 mmol/l Glycin wurde schließlich das Konjugat mit 1 % (g/v) BSA stabilisiert, mit 0,01 % (g/v) Thimerosal konserviert, portioniert und bei -80 °C gelagert.

Als Nachweisgrenze für Sandwich-Verfahren wurde nach DIN 58967 die Extinktion antigenfreier Kontrollansätze plus deren dreifache Standardabweichung definiert. Die Testparameter und Immunoreagenzien-Konzentrationen wurden in mehreren Vorversuchen optimiert, wobei hohe Extinktionen bei antigenhaltigen Ansätzen und eine möglichst niedrige Extinktion antigenfreier Kontrollansätze (Background) angestrebt wurde. Zu diesem Zweck wurden sowohl verschiedene Beschichtungspuffer (PBS und Bicarbonatpuffer), als auch mehrere Blockierungsreagenzien (z.B. 1 % humanes Serumalbumin (HSA), 1 % Gelatine, 3 % bovines Casein) getestet. Eine leichte Verbesserung der Nachweisgrenzen konnte durch den Zusatz von 0,5 % (v/v) Tween® 20 zu den Sporenverdünnungen erreicht werden. Zudem wurde überprüft, ob eine weitere Verbesserung der Sensitivität durch Biotinylierung bzw. Digoxigenierung der Antikörper und nachfolgender Detektion mittels peroxidasemarkiertem Extravidin bzw. Schaf-anti-Digoxigenin-Antiseren erreicht werden konnte. Ebenfalls wurde der Einsatz von chemilumineszierenden Substraten anstelle des chromogenen Substrates im Hinblick auf einer möglichen Sensitivitätssteigerung des Testverfahrens getestet.

Digoxigenierung bzw. Biotinylierung der Detektionsantikörper führte im Vergleich zum Direktnachweis der Sporen mit peroxidasemarkierten Antikörpern nur zu einer geringfügigen Verbesserung der Nachweisgrenzen (Abb. 10), und wurde daher für die weitere Charakterisierung der Antiseren auch im Hinblick auf den erhöhten Zeit- und Materialaufwand nicht mehr eingesetzt. Alternativ wurde statt der Chromogen-Substrat-Lösung eine Chemilumineszenz-Substrat-Lösung verwendet und die Lumineszenz gemessen. Die erreichten Nachweisgrenzen waren $3,3 \times 10^4$ bzw. $5,4 \times 10^3$ KbE/ml. Die Extinktion antigenfreier Kontrollansätze lag bei 0,045, mit chemilumineszierendem Substrat erreichten sie 112.552 relative Lumineszenzeinheiten. Abb. 10 zeigt die Standardkurven der optimierten Verfahren zum Nachweis von *B. cereus* Sporen.

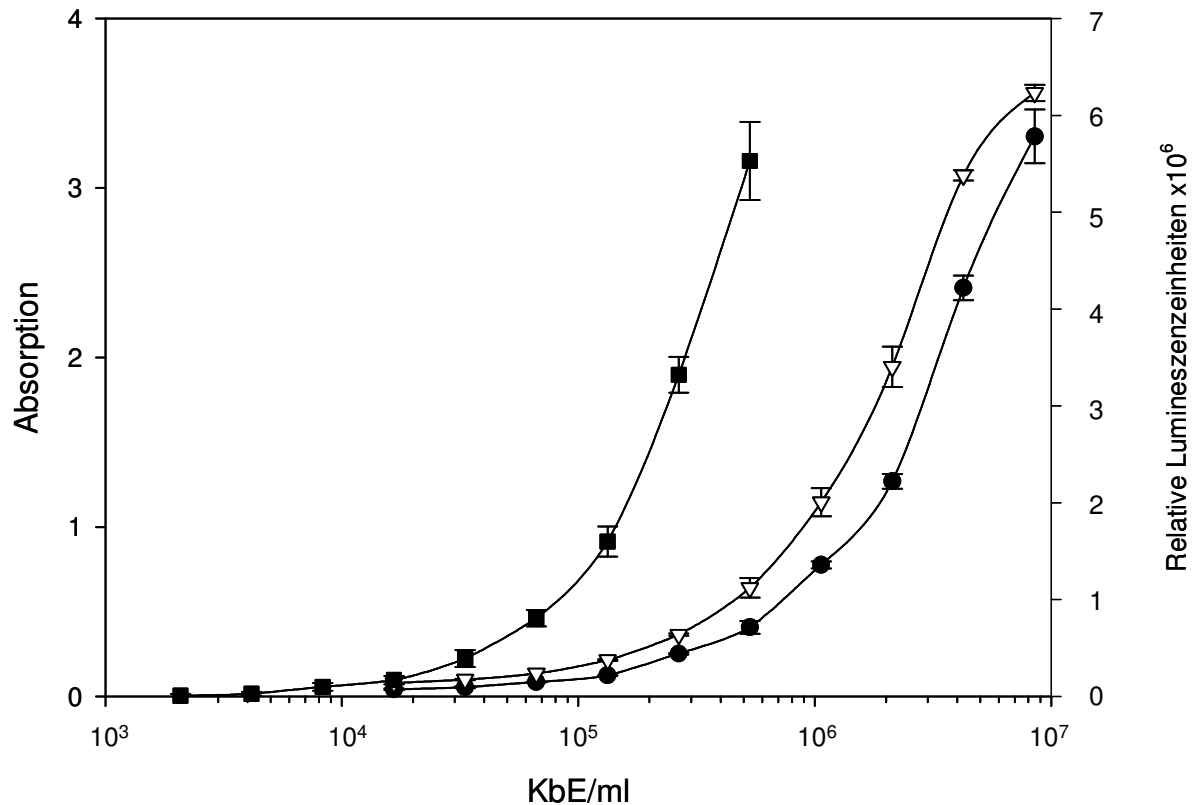


Abbildung 10: Standardkurven der auf Kaninchenserum basierenden Sandwich-EIAs zum Nachweis von Sporen des *B. cereus* Stammes DSM 4312 unter Verwendung chemilumineszierender (—■—) bzw. chromogener (—▽—●—) Substrate. Als Detektionsantikörper wurden peroxidasemarkierte (—●—■—) bzw. digoxigeninmarkierte (—▽—) Antiseren eingesetzt.

3.3.5.2.2 Charakterisierung

Die Sandwich-EIAs wurden nach Optimierung unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte mit gefällten Kaninchenserum der Abnahmewoche 17 (Kaninchen #74) in der Verdünnung 1:2000. Die Proben wurden in seriellen Verdünnungsreihen (*B. cereus* Sporen, 1:500 bis 1:1.093.500 verdünnt (entspricht $2 \times 10^7 - 9 \times 10^2$ KbE/ml) in 0,5 % (v/v) Tween® 20/PBS) auf die Mikrotiterplatten gegeben. Die Zugabe der peroxidasemarkierten Detektionsantikörper, Kaninchen #74-HRP, erfolgte 1:2000 in 1 % (g/v) Casein/PBS verdünnt. Alle weiteren Parameter entsprachen denjenigen, die unter 3.2.1.2 beschrieben wurden.

Die mAk wurden in indirekten EIAs untersucht. Dabei wurden die Sporen für den mAk 1F12 von 1:20 bis 1:43740 (entspricht $2,3 \times 10^5 - 5 \times 10^8$ KbE/ml) und für mAk 2E7 von 1:500 bis 1:1093500 (entspricht $9 \times 10^2 - 2 \times 10^7$ KbE/ml) verdünnt eingesetzt. Die

antikörperhaltigen ZKÜ wurden in den Verdünnungen 1:20 (mAk 1F12) bzw. 1:50 (mAk 2E7) verwendet. Die übrigen Parameter entsprachen denjenigen, die unter 3.2.1.1 beschrieben wurden.

3.3.5.2.2.1 Intra- und Intergenusspezifität

Für die Erstellung einer Stammbibliothek von *Bacillus*-Sporen wurden über 100 Stämme angezüchtet, wobei von insgesamt 77 *B. cereus* Stämmen, 4 Stämmen aus der Cereus-Gruppe, und 3 anderen Bazillenstämmen ausreichend Sporenmaterial gewonnen werden konnte. Die Keime stammten aus der Stammbibliothek des Lehrstuhls und wurden v.a. aus Milch, Milchprodukten und anderen Lebensmitteln isoliert (s. Anhang, Tab. A4, A5 und A6).

Zur Ermittlung der Spezifität der beiden mAk vom IgG₁-Subtyp wurden Sporen dieser Stammbibliothek zur Beschichtung von Mikrotiter-Platten eingesetzt. In den indirekten EIAs reagierte mAk 1F12 insgesamt mit 46 der 77 eingesetzten *B. cereus*-Stämme. Gegenüber den 4 Stämmen der Cereus-Gruppe und den 3 Stämmen der anderen Bazillen zeigte er keine Reaktion, ein Hinweis darauf, dass dieser mAk eine hohe Spezifität für *B. cereus* aufweist. Der höher affine mAk 2E7 zeigte hingegen eine breitere Reaktivität. 50 der 77 *B. cereus*-Stämme reagierten positiv, aber auch 2 Stämme der Cereus-Gruppe (2x *B. mycoides*) und ein Stamm der anderen Bazillen (*B. licheniformis*). Abb. 11 zeigt die Verteilung der Reaktionsmuster der beiden mAk im Überblick.

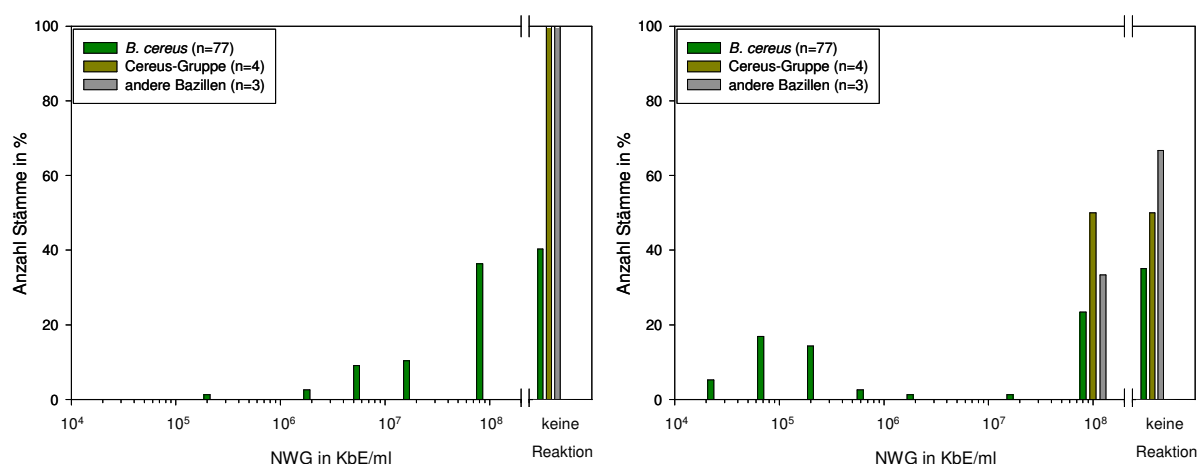


Abbildung 11: Reaktivität der mAk 1F12 (links) und 2E7 (rechts) gegenüber der *Bacillus* Sporen-Stammbibliothek in indirekten EIAs

Im Sandwich-EIA reagierten die polyklonalen Kaninchenantikörper mit allen Vertretern von *B. cereus* und der Cereus-Gruppe. Ein Stamm der anderen Bazillenstämme (aus der Spezies *B. licheniformis*) zeigte keine Reaktion. Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 10^4 und 10^7 KbE/ml, wobei die *B. cereus* Stämme die niedrigsten Werte zwischen 10^4 und 10^6 KbE/ml erreichten. Abb. 12 gibt hierzu einen Überblick.

Die mittleren Nachweisgrenzen der Antikörper für die verschiedenen Gruppen von Bazillen sind in Tab. 13 zusammengefasst.

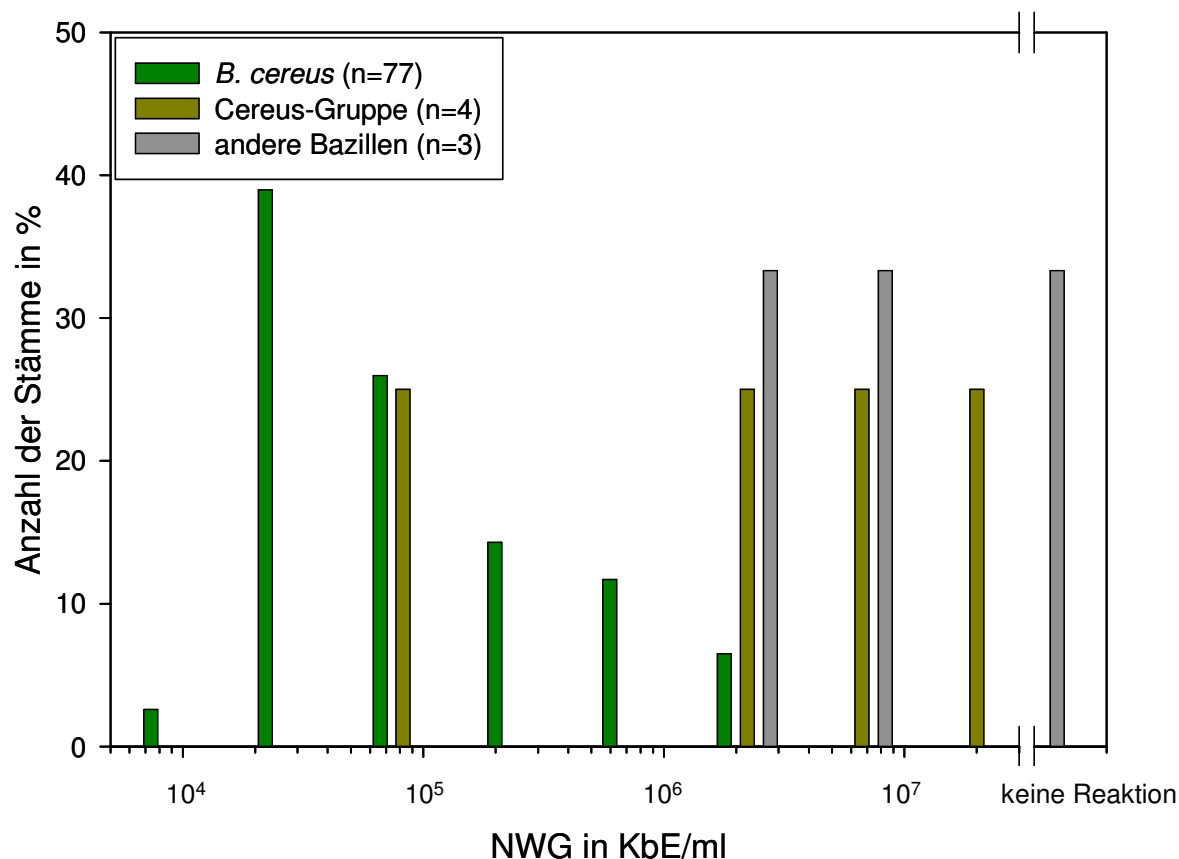


Abbildung 12: Prozentuale Verteilung der Nachweisgrenzen (NWG) für Sporenpräparationen von Keimen des Genus *Bacillus* im auf Kaninchenserum basierenden Sandwich-EIA.

Tabelle 13: Durchschnittliche Nachweisbarkeit von Sporen der untersuchten Bazillenstämmen in den optimierten EIA-Verfahren. Insgesamt wurden 77 Stämme *B. cereus*, 4 Stämme aus der Cereus-Gruppe (2x *B. mycoides*, 2x *B. thuringiensis*) und 3 andere Bazillen (2x *B. licheniformis*, 1x *B. subtilis*) getestet. n gibt die Zahl der reaktiven Stämme an, die in die Berechnung eingeflossen sind.

Mittlere Nachweisgrenze (KbE/ml)						
	n	PAk	n	MAk 1F12	n	MAk 2E7
<i>B. cereus</i>	77	$2,8 \times 10^5$	46	$6,0 \times 10^6$	50	$1,3 \times 10^5$
Cereus-Gruppe	4	$1,0 \times 10^7$	0	u.N.*	2	$> 2,0 \times 10^7$
Andere Bazillen	2	$3,6 \times 10^6$	0	u.N.*	1	$> 2,0 \times 10^7$

* u.N. = unter der Nachweisgrenze

Zur weiteren Charakterisierung des Kaninchen-Antiserums zum Nachweis von *Bacillus*-Sporen wurden auch vegetative Formen der eingesetzten Referenzstämmen im Sandwich-EIA getestet. Es zeigte sich, dass bei hohen Keimgehalten auch die vegetativen Formen der Bazillen mit dem Kaninchenserum reagierten, wobei allerdings unklar blieb, ob die Reaktion nicht auch auf eine beginnende Sporulation der Testkeime zurückzuführen war, da für diese Tests eine Keimpräparation eingesetzt wurde, die sich bereits in einer stationären Wachstumsphase befand. Abb. 13 zeigt Standardkurven für den Sandwich-EIA mit Kaninchenserum mit Sporen und vegetativen Formen im Vergleich. Bei den mAk konnte keine Reaktivität mit vegetativen Formen von *B. cereus* nachgewiesen werden.

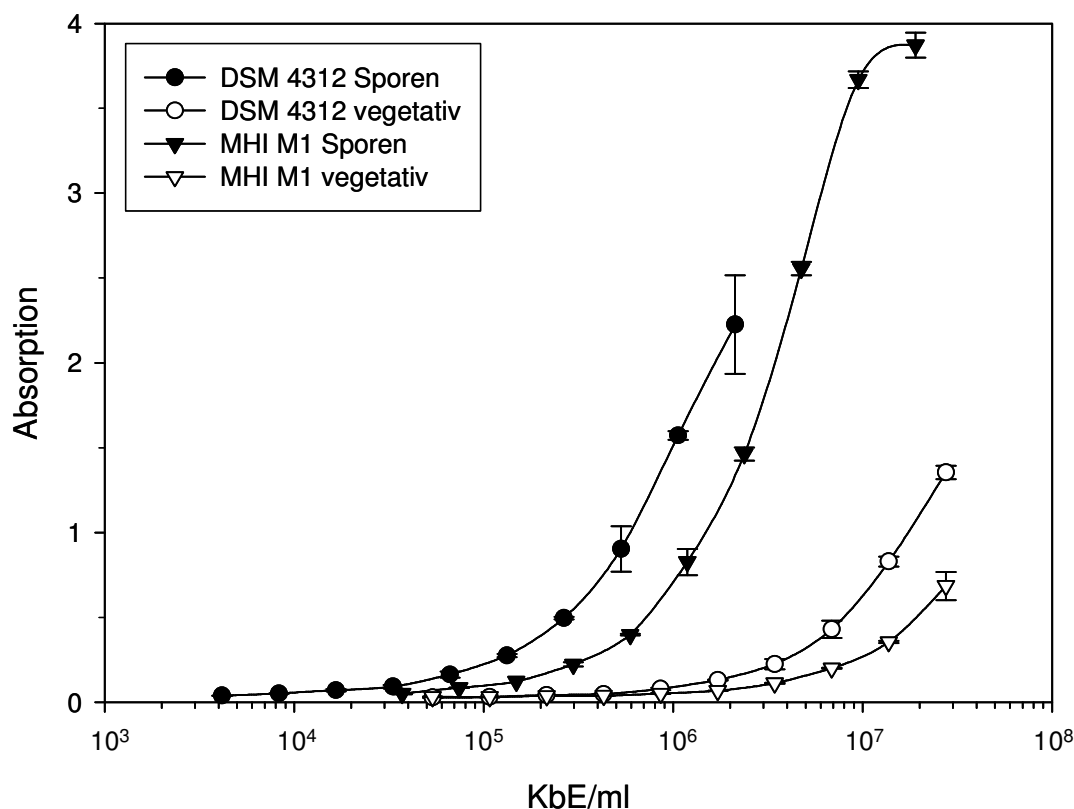


Abbildung 13: Vergleichende Darstellung der im Sandwich-EIA erhaltenen Standardkurven für Sporen bzw. vegetative Formen von zwei *B. cereus* Referenzstämmen.

3.3.5.2.2.2 Immunfluoreszenz

Um die Bindung der Antikörper an die Oberflächen intakter Sporen nachzuweisen, wurde der Immunfluoreszenztest wie unter 3.2.4 beschrieben durchgeführt.

Die Reaktion des Kaninchenserums mit den Sporen von *B. cereus* konnte erfolgreich dargestellt werden. Abb. 14 zeigt fluoreszenzmarkierte *B. cereus*-Sporen im Phasenkontrast und nach Fluoreszenzinduktion. Die hohe Affinität der Kaninchenserum für vitale Sporen, sowie deren breite Reaktivität mit Vertretern der *Cereus*-Gruppe (3.3.5.2.2.1) prädestinierten diese Antikörper für den Einsatz in der Bioaffinitätsseparation. Die mAk gegen Sporen von *B. cereus* zeigten in der Immunfluoreszenz hingegen keine Reaktion.

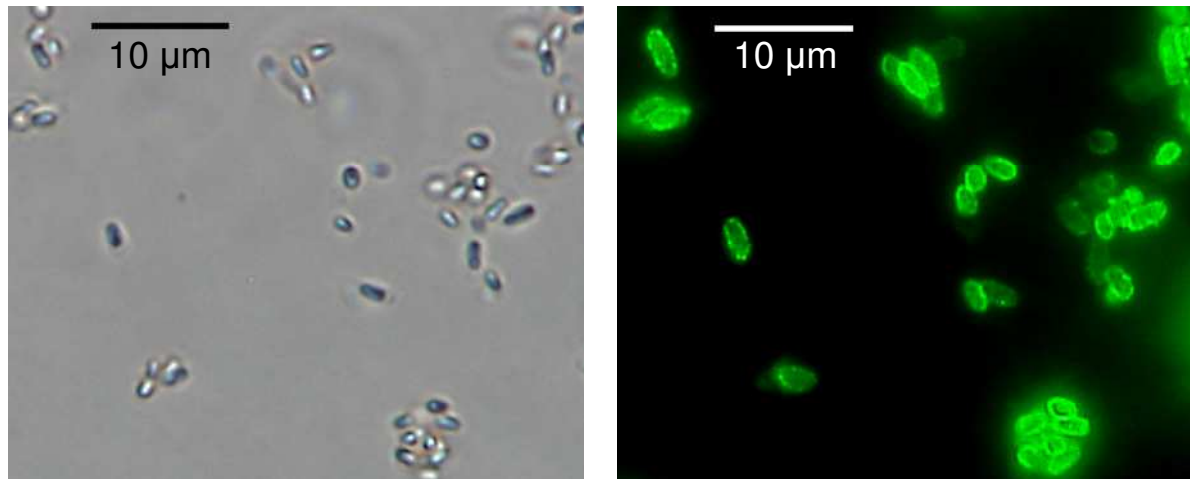


Abbildung 14: Sporen von *B. cereus* Stamm DSM 4312 im Phasenkontrast und in der Immunfluoreszenz, markiert mit Kaninchenserum des Tieres #74 (17. Abnahmewoche)

Zur weiteren Charakterisierung der Reaktivität dieser mAk wurden daher Immunoblots eingesetzt. Die Präparation von Sporen-Oberflächenproteinen, die Auftrennung der Proteine und das Blotting erfolgte wie in 3.3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben.

MAk 2E7 zeigte hierbei auch nach mehreren Wiederholungen des Versuchs nur diffuse Schwärzungen in den antigenhaltigen Banden der Membranen. Dagegen reagierte der mAk 1F12 deutlich mit einer Oberflächenproteinpräparation des Stammes MHI M1, im Bereich von 21 kDa. Der entsprechende Immunoblot ist in Abb. 15 dargestellt.

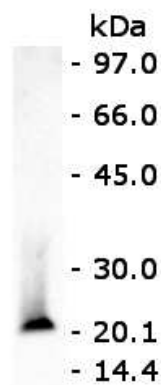


Abbildung 15: Reaktivität des mAk 1F12 mit einer Oberflächen-Proteinpräparation von Sporen des *B. cereus*-Stammes MHI M1 im Immunoblot

3.3.5.3 Antikörper gegen *S. aureus*

Aus den Zellfusionsexperimenten mit den Mäusen, die mit den Membranfraktionen der Keime nach Lysostaphin-Behandlung (*S. aureus*-Ghosts, s. 3.3.1.3.2) immunisiert worden waren, konnten nur zwei Zelllinien etabliert werden. Beide produzierten mAk stellten sich im weiteren Verlauf als Isotyp IgM heraus. Aus den anderen Immunisierungsreihen konnten hingegen neben den beiden polyklonalen Kaninchenseren eine ganze Reihe von mAk des IgG-Subtyps zum Nachweis von *S. aureus* gewonnen werden, deren wesentliche Charakteristika in Tab. 14 zusammengefasst sind. Aus der Immunisierung mit *S. aureus* Protein-Präparationen (Lysostaphin-Überstände) konnten drei mit Protein-A reaktive Klone etabliert werden. Das Screening erfolgte hierbei mit inaktiviertem Protein-A (3.3.2.3).

Tabelle 14: Übersicht zu den etablierten mAk zum Nachweis von *S. aureus*

Immunogen	Klon	Subtyp	Titer der ZKÜ	Apparente Affinität (KbE)
Lysostaphin-Überstand	1E9 ¹	IgG ₁	> 1:6500	< 2 ng/ml Prot.-A
	2A2 ¹	IgG _{2a}	1:1000	< 2 ng/ml Prot.-A
	2G6 ¹	IgG _{2b}	> 1:6500	< 2 ng/ml Prot.-A
	2B2 ²	IgG _{2a}	1:8000	3,9 x 10 ⁶
	2D12 ²	IgG ₁	> 1:6500	7,8 x 10 ⁶
	2H1 ²	IgG ₁	> 1:6500	7,8 x 10 ⁶
PFA-inaktivierte Keime	1D7 ²	IgG _{2b}	1:6500	2,9 x 10 ⁶
	1F11 ²	IgG ₁	1:1000	3,2 x 10 ⁶
	1G4 ³	IgG _{2b}	1:1600	2,5 x 10 ⁶
	2C2 ³	IgG ₁	1:1000	2,5 x 10 ⁶
	2G6 ³	IgG ₁	1:500	6,3 x 10 ⁵
	2H1 ³	IgG ₁	1:1800	1,3 x 10 ⁶

¹ reaktiv mit Protein-A, überprüft in indirekten EIAs unter Verwendung von inaktiviertem Protein-A (3.3.2.3)

² reaktiv in indirekten EIAs unter Verwendung des *S. aureus* Stammes DSM 20491

³ reaktiv in Sandwich-EIAs unter Verwendung des *S. aureus* Stammes DSM 20491

3.3.5.3.1 Sensitivität

3.3.5.3.1.1 Apparente Affinität der monoklonalen Antikörper

Das Screening der apparenten Affinität der mAk wurde in indirekten EIA-Systemen (3.2.1.1) bzw. dem modifizierten Sandwich-EIA (3.3.5.3.1.3) durchgeführt. Dabei wurden die Antikörper in fester Konzentration und die Antigene als Verdünnungsreihen eingesetzt. Die erhaltenen Werte sind in Tab. 14 zusammengefasst, Abb. 16 zeigt exemplarisch für einige der in den indirekten EIAs reaktiven mAk die unter diesen Bedingungen erhaltenen Antigen-Titerkurven.

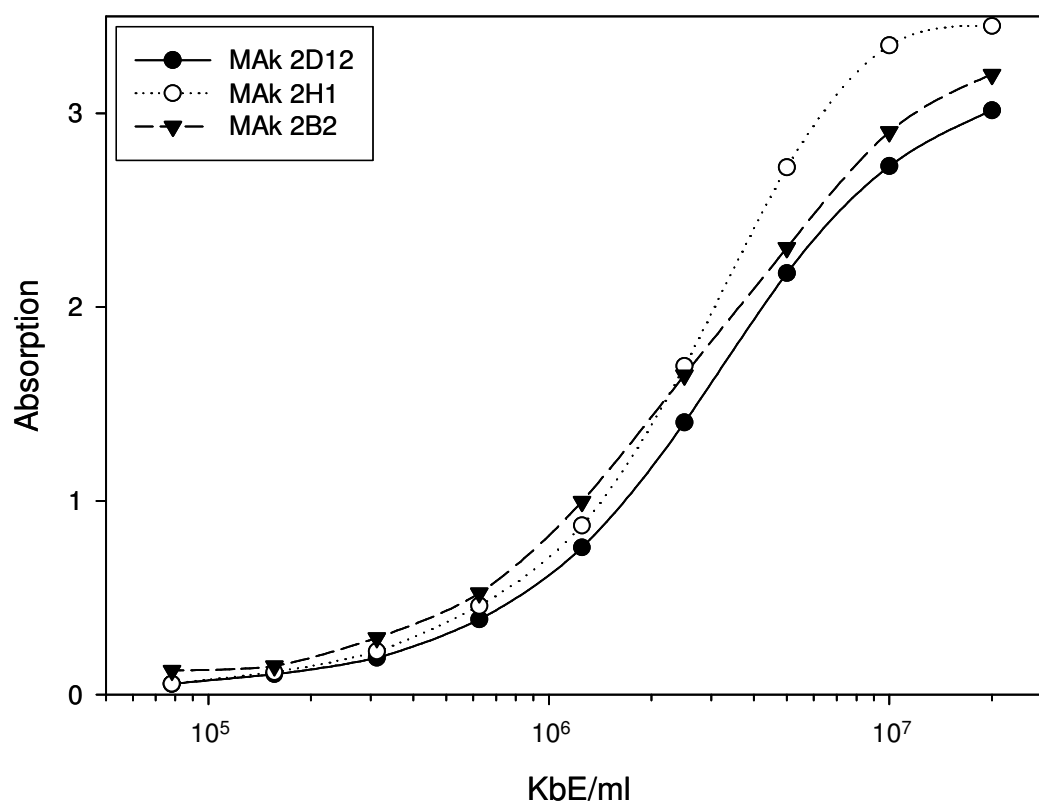


Abbildung 16: Antigen-Titerkurven der mAk 2D12, 2H1 und 2B2 im indirekten EIA. Die Beschichtung der Mikrotiterplatten erfolgte mit lebenden Keimen des *S. aureus* Stammes DSM 20491.

3.3.5.3.1.2 Sandwich-EIA basierend auf polyklonalem Kaninchenserum

Die Sandwich-EIA-Verfahren wurden analog zu den bei den *B. cereus*-Sporen beschriebenen Verfahren (3.3.5.2.1.2) entwickelt. Für *S. aureus* wurden die Mikrotiterplatten mit Kaninchenserum #71 oder #75 (jeweils 17. Abnahmewoche) in einer Verdünnung von 1:4000 in Bicarbonatpuffer beschichtet. Analog zu den HRP-Konjugaten gegen *B. cereus*-Sporen wurden auch Konjugate für *S. aureus* hergestellt. Diese wurden in der Verdünnung 1:3000 eingesetzt. Orientierende Versuche, das Antikörper-Enzym-Konjugat durch Gel-Permeations-Chromatographie über eine Sephacryl-S200 Säule weiter zu reinigen, um so eine Reduktion der Absorption antigenfreier Kontrollansätze (Background) zu erreichen, führten zu keiner deutlichen Verbesserung der Leistungsparameter des Sandwich-EIA. Nach Optimierung des Sandwich-EIAs konnten für den zur Etablierung eingesetzten Referenzstamm DSM 20491 Nachweisgrenzen von $9,1 \times 10^3$ KbE/ml realisiert werden, der Cut-Off Wert des EIA lag bei 0,22 Absorptionseinheiten.

Da manche Staphylokokken als Zellwandprotein Protein-A exprimieren, das in der Lage ist, unspezifisch an den Fc-Teil von Antikörpern zu binden, wurden alle in der Stammbibliothek befindlichen Stämme auf diesen Parameter untersucht. Hierzu wurden die Staphylokokken als Verdünnungsreihen in einem irrelevanten Sandwich-EIA untersucht (3.2.1.2), eingesetzt wurde hierbei das zum Nachweis von *B. cereus*-Sporen entwickelte Testserum. Da dieses Serum keine Antikörper enthält, die spezifisch gegen *S. aureus* gerichtet sind, konnten die erhaltenen Mess-Signale auf die Expression von Protein-A, und dessen Bindung an den Fc-Teil der verwendeten Antikörper zurückgeführt werden. Wenn auch bei der niedrigsten eingesetzten Verdünnung (1:500) keine signifikante Absorption gemessen wurde, wurde von keiner nennenswerten Expression von Protein-A ausgegangen. Bei höheren Mess-Signalen wurden zur weiteren Differenzierung die Werte derjenigen Verdünnungsstufe herangezogen, bei denen die Absorption am nächsten an 1,0 lag. War dies der Fall bei Verdünnungsstufen von 500-1500, wurde die Expression von Protein-A als mittel, bei noch höheren Werten als hoch beurteilt. Abb. 17 zeigt die Verteilung der Eigenschaften koagulasen negativ/-positiv und Protein-A-Expression bei den in der Staphylokokken-Stammbibliothek implementierten Stämmen.

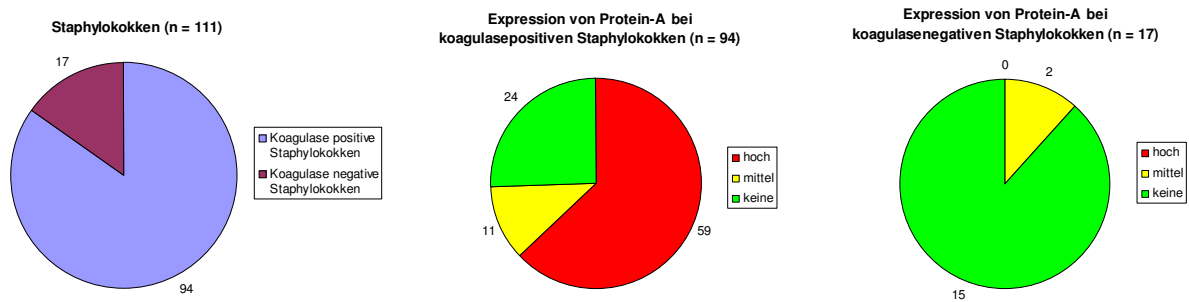


Abbildung 17: Merkmale der Staphylokokken in der Stammbibliothek. Links: Verteilung der Eigenschaft koagulasenativ bzw. -positiv. Mitte und rechts: Einfluss von Protein-A innerhalb der Koagulasegruppen.

Um die Reaktivität der verschiedenen Staphylokokken-Stämme im spezifischen *S. aureus* Sandwich-EIA unabhängig der Expression von Protein-A zuverlässig beurteilen zu können, wurden die Staphylokokken vor der Untersuchung mit unspezifischen Kaninchenserum vorinkubiert. Dadurch werden die Bindungsstellen von Protein-A abgesättigt. Zu diesem Zweck wurde von den Keimpräparationen ($\sim 10^{11}$ KBE/ml) eine 1:50-Verdünnung in PBS angelegt, davon 100 μ l mit dem gleichen Volumen eines unspezifischen Kaninchensersum versetzt und für 30 Minuten bei 350 Upm bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 10.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, die Pellets in 1 ml PBS aufgenommen und anschließend in den EIA eingesetzt. Abb. 18 zeigt den Effekt der Vorbehandlung der Keime mit unspezifischem Serum auf deren Reaktivität im spezifischen Sandwich-EIA bzw. dem zu Kontrollzwecken eingesetzten *B. cereus* Sporen EIA. Abb. 19 verdeutlicht den Absättigungseffekt anhand von Immunfluoreszenz-Aufnahmen.

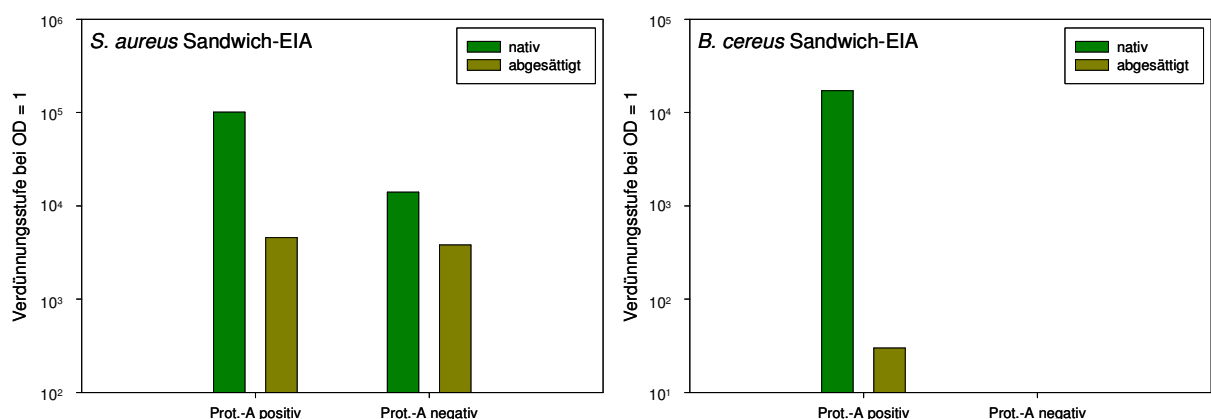


Abbildung 18: Effekt der Vorbehandlung von *S. aureus* Keimen mit unspezifischen Seren zur Absättigung von Protein-A auf deren Reaktivität im EIA. Dargestellt sind exemplarisch die *S. aureus* Stämme DSM 20372 (Protein-A positiv) und MHI 305 (Protein-A negativ). Links: Ergebnisse im *S. aureus*-spezifischen Sandwich-EIA; Rechts: Ergebnisse des zu Kontrollzwecken eingesetzten *B. cereus* Sandwich-EIA.

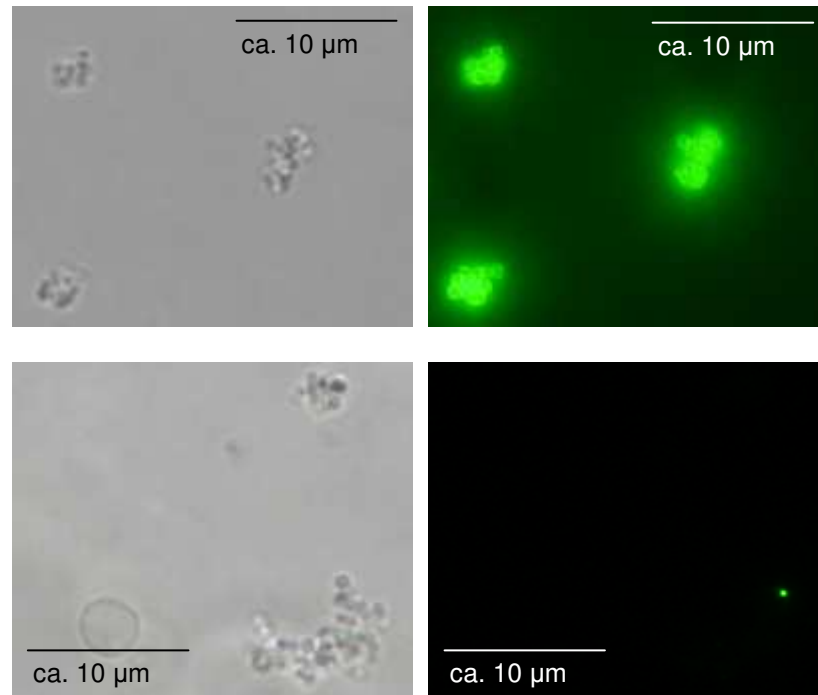


Abbildung 19: Staphylokokken im Phasenkontrast und in der Immunfluoreszenz. Oben: Reaktivität eines Protein-A positiven *S. aureus* Stammes mit Alexa 488-konjugierten Antikörpern (Reaktivität basiert auf der Aktivität von Protein-A). Unten: Nach Absättigung mit unspezifischem Serum; Interaktion zwischen Protein-A der Keime und den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern ist nicht mehr nachweisbar.

Generell wurde bei allen Stämmen nach der Absättigung mit unspezifischem Serum ein Rückgang der Reaktivität im EIA festgestellt. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die an Protein-A gebundenen Antikörper die Reaktivität der spezifischen Antikörper sterisch behindern (Epitop-Masking). Einen Vergleich der mit nativen bzw. mit unspezifischem Kaninchenserum abgesättigten Keimen erhaltenen Standardkurven im Sandwich-EIA zeigt Abb. 20.

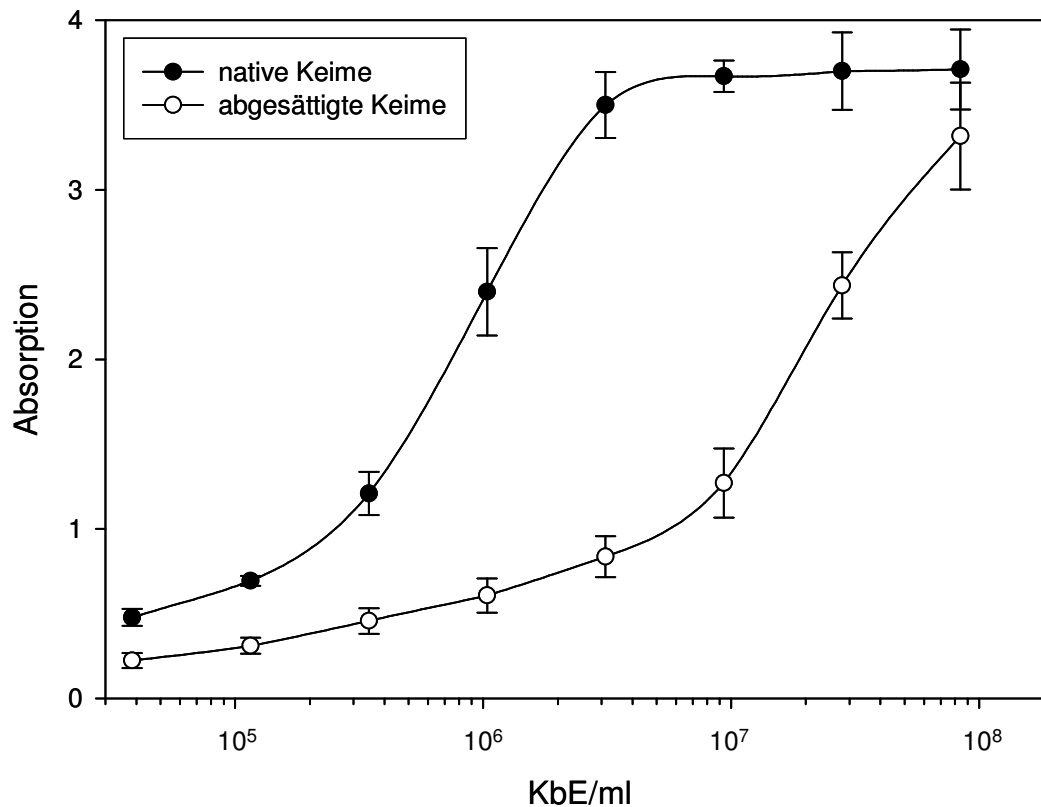


Abbildung 20: Standardkurven des Kaninchenserum-Sandwich-EIA zum Nachweis des Protein-A positiven *S. aureus* Referenzstammes DSM 20372. Die beiden Kurven zeigen den Unterschied zwischen nativen und mit unspezifischem Kaninchenserum abgesättigten Keimen. Die Absättigung vermindert den unspezifischen Einfluss von Protein-A auf die Reaktion im EIA, resultiert aber auch in einer deutlichen Reduktion des Mess-Signals.

3.3.5.3.1.3 Kombinations-Sandwich-EIA mit poly- und monoklonalen Antikörpern

Zur Überprüfung der Spezifität der mAk und zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen durch Protein-A exprimierende Stämme wurden die mAk in einem modifizierten Sandwich-EIA eingesetzt, bei dem Mikrotiterplatten mit Ziegenantikörpern beschichtet wurden, die mit dem Fc-Teil von Mausantikörpern reagieren (3.2.1.2). Über diese Festphase wurden die mAk gerichtet an den Platten immobilisiert. Danach erfolgte die Zugabe von Verdünnungsreihen der mit Kaninchenserum abgesättigten Keime (3.3.5.3.1.2), sowie der Nachweis mittels Kaninchenserum-HRP-Konjugat (3.3.5.2.1.2).

Abb. 21 zeigt exemplarisch den Verlauf einer unter diesen Bedingungen generierten Standardkurve bei Verwendung des mAk 2C2 und des Protein-A negativen *S. aureus* Referenzstammes DSM 20491.

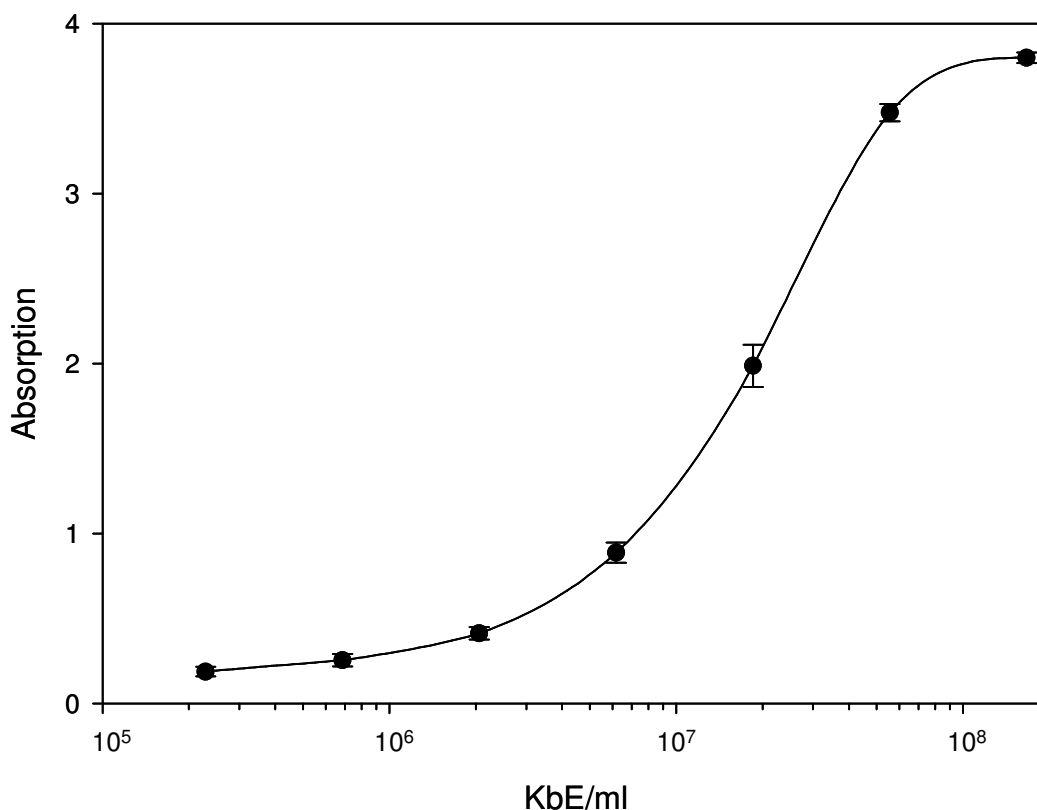


Abbildung 21: Standardkurve des Kombinations-Sandwich-EIA zum Nachweis von *S. aureus* (DSM 20491 Ribolysat) bei Verwendung des mAk 2C2.

3.3.5.3.2 Charakterisierung

3.3.5.3.2.1 Intra- und Intergenusspezifität

Um die Intra- und Intergenusspezifität der Kaninchenserum gegenüber Staphylokokken zu überprüfen, wurden insgesamt 111 Stämme des Genus *Staphylococcus* angezüchtet. 94 davon waren koagulasepositiv, 17 negativ (s. Tab. A7 und A8 im Anhang). Bei der Untersuchung der mit unspezifischem Kaninchenserum vorbehandelten (3.3.5.3.1.2) Staphylokokkenstämmen aus der Stammbibliothek zeigte sich, dass der Sandwich-EIA zum Nachweis von *S. aureus* eine breite Spezifität aufweist. Bis auf einen koagulasenegativen, präsumtiv Protein-A-negativen Stamm aus der Spezies *S. xylosus* reagierten alle im EIA eingesetzten Stämme (Tab. 15).

Tabelle 15: Reaktivität von Staphylokokken-Stämmen im Kaninchenserum-Sandwich-EIA

Untersuchungs-material	Präsumtive Expression von Protein-A	Anzahl im EIA reaktiver Stämme %
Koagulasepositive Staphylokokken n = 94	positiv n = 70	100 %
	negativ n = 24	100 %
Koagulasenegative Staphylokokken n = 17	positiv n = 2	100 %
	negativ n = 15	93,3 %

Die Nachweisgrenzen lagen bei den koagulasepositiven Staphylokokken deutlich unter denjenigen der koagulasenegativen Stämme. Die niedrigsten Werte für *S. aureus*-Stämme lagen bei $9,1 \times 10^3$ KbE/ml in nativer Form und bei $8,2 \times 10^4$ KbE/ml für Proben, die mit unspezifischem Serum abgesättigt waren. Eine Übersicht zu den Nachweisgrenzen der verschiedenen Staphylokokken-Gruppen zeigt Abb. 22.

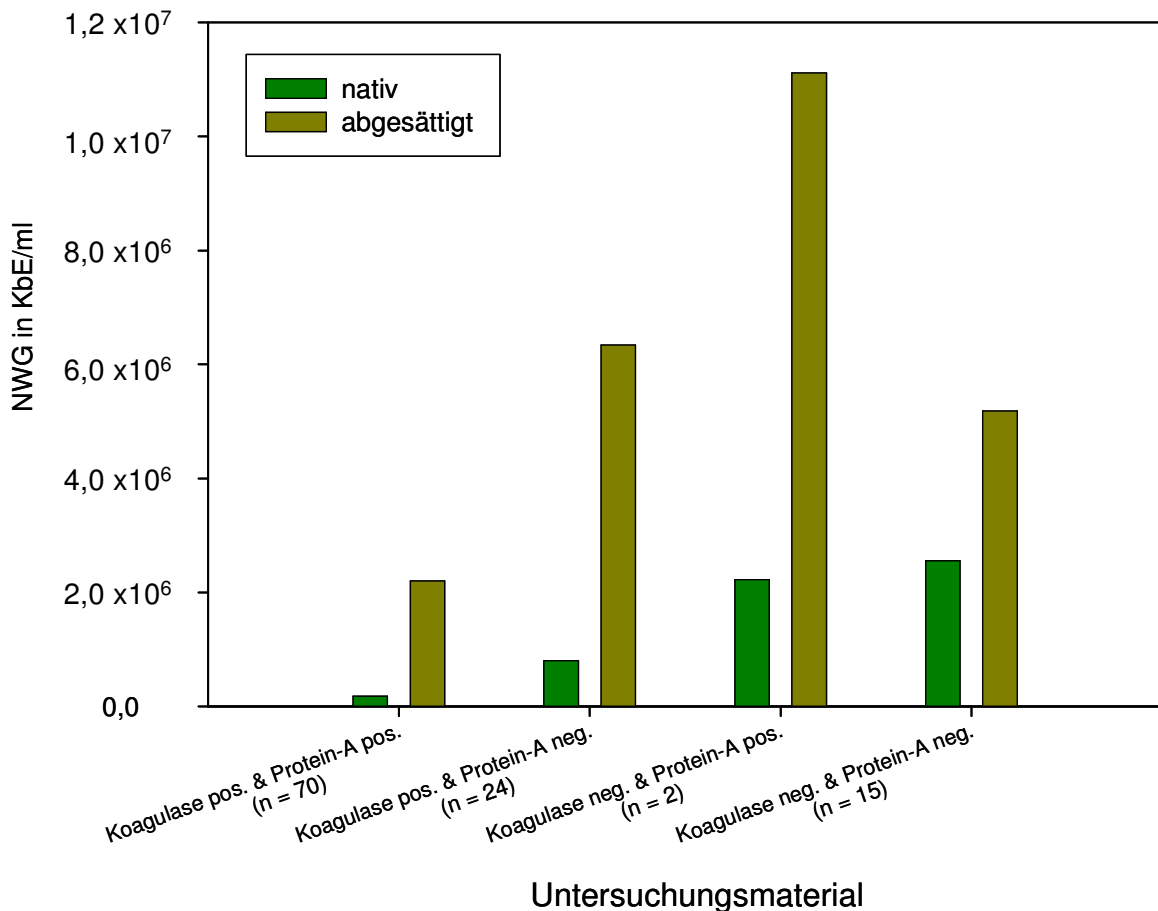


Abbildung 22: Durchschnittliche Nachweisgrenzen (NWG) des Sandwich-EIA zum Nachweis von Staphylokokken in Abhängigkeit von der Expression von Koagulase bzw. Protein-A. Präparationen der Stämme wurden jeweils in nativer Form bzw. nach Vorinkubation mit unspezifischem Kaninchenserum untersucht.

Zur Überprüfung der Spezifität der zur Verfügung stehenden mAk gegen *S. aureus* wurden in einem ersten Screening 20 aus der Stammbibliothek selektierte Stämme (3 koagulasenegativ, 17 koagulasenaktiv) getestet wie unter 3.3.5.3.1.3 beschrieben. Trotz Absättigung des Protein-A (3.3.5.3.1.2) konnten mit den drei gegen dieses Oberflächenprotein gerichteten mAk 2A2, 2G6 und 1E9 Protein-A exprimierende Keime zuverlässig unter diesen EIA-Bedingungen nachgewiesen werden. Die höchste Affinität zeigte hierbei der mAk 1E9, es wurden Nachweisgrenzen von bis zu 2×10^4 KbE/ml erreicht. Die weiteren aus den Immunisierungen mit Lysostaphin-Überständen resultierenden mAk 2B2, 2D12 und 2H1 zeigten hingegen nur eine schwache Reaktivität, ein Hinweis darauf, dass diese Antikörper vorzugsweise mit intrazellulären Epitopen reagieren. Bei Verwendung des mAk 1E9 im Sandwich-EIA reagierten 74 der untersuchten 87 *S. aureus* Stämme positiv, wobei in der

Regel zwischen der in einem irrelevanten Sandwich-EIA prognostizierten Protein-A Expression (3.3.5.3.1.2) und den Ergebnissen des spezifischen Enzymimmuntests eine gute Übereinstimmung zu beobachten war. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das von mAk 1E9 erkannte Epitop auf Protein-A hochkonserviert ist. Bei den mAk, bei denen als Immunogen PFA-inaktivierte Keime eingesetzt worden waren, wurden hingegen unterschiedliche Reaktionsprofile erhalten. Die beiden mAk 1D7 und 1F11 wiesen nur eine geringe Affinität auf, während die mAk 1G4, 2G6 und 2H1 ähnlich wie das polyklonale Kaninchenantiserum sowohl mit koagulasepositiven als auch mit koagulasenegativen Staphylokokken reagierten. Als besonders interessant erwies sich der mAk 2C2, der in diesem Vorscreening nur mit *S. aureus* Stämmen reagierte. Diese Selektivität konnte in weiteren Versuchen, bei denen das komplette, 117 Isolate umfassende Stammset eingesetzt wurde, bestätigt werden: Alle koagulasenegativen Staphylokokken, sowie *S. hyicus* und *S. intermedius* Stämme reagierten nicht, während alle *S. aureus* Stämme detektiert wurden (Abb. 23).

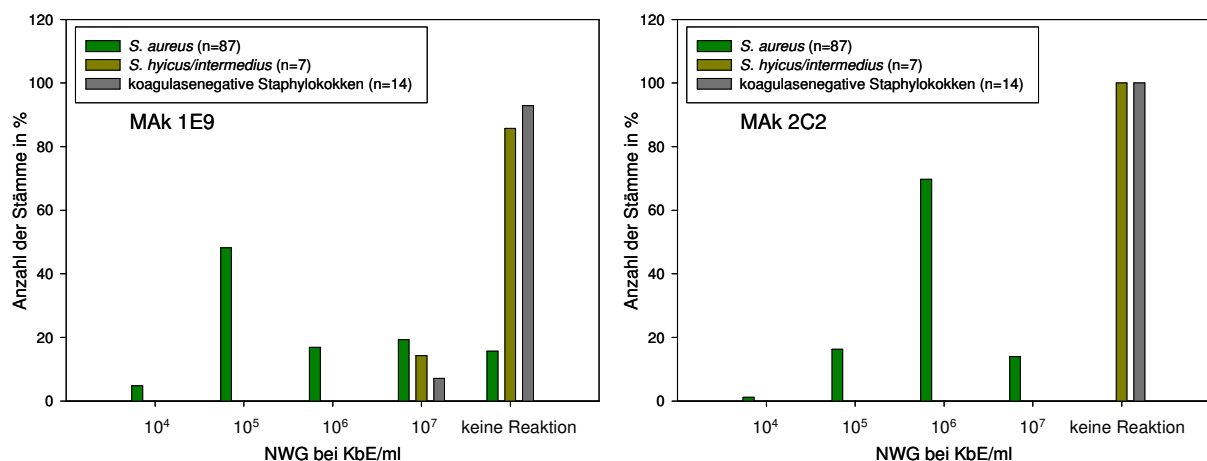


Abbildung 23: Reaktivität der mAk 1E9 und 2C2 gegenüber den mit Kaninchenserum abgesättigten *S. aureus*-Keimpräparationen aus der Stammbibliothek im Sandwich-EIA

3.3.5.3.2.2 Agglutinationsreaktion

Um einen Hinweis darauf, welche Zielantigene der *S. aureus* Keime von den Kaninchenseren erkannt werden und zum anderen Informationen zur Zusammensetzung der Subpopulationen der Ig-Typen in diesen Seren zu erhalten, wurde ein Agglutinationstest durchgeführt. Dafür wurde Koloniematerial von 8 verschiedenen Staphylokokken-Stämmen mit gefällttem Serum des Kaninchens #71 (1:10-verdünnt) bzw. einem irrelevanten Serum oder mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt, und die Quervernetzung der Bakterien

über die optisch sichtbare Agglutination beurteilt. Der Test wurde sowohl mit lebenden, als auch mit autoklavierten Staphylokokken durchgeführt. Ein Beispiel für die Auswertung zeigt Abb. 24.

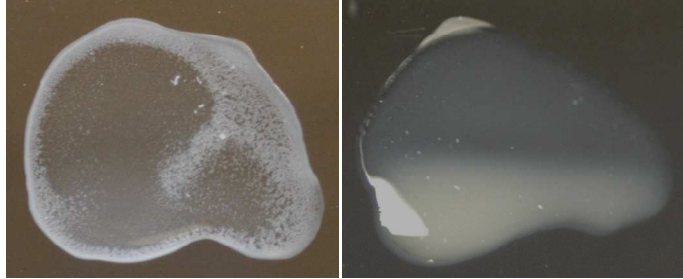


Abbildung 24: *S. aureus* MHI 304 im Agglutinationstest;
links: mit Kaninchenserum #71 (positiv);
rechts: mit irrelevantem Kaninchenserum (negativ);

Alle koagulasepositiven Staphylokokken ($n = 5$) agglutinierten mit Kaninchenserum #71, und zeigten bis auf einen Stamm keine Autoagglutination mit physiologischer Kochsalzlösung oder Agglutination mit irrelevantem Serum. Ein identisches Bild zeigte sich auch bei der Verwendung autoklavierter Keime, ein Hinweis darauf, dass die im Serum vorhandenen vernetzungsfähigen Antikörper vom IgM-Subtyp v.a. mit hitzestabilen Peptidoglykanstrukturen der Keime reagieren. Einen Überblick über die Versuche zeigt Tab. 16.

Tabelle 16: Ergebnisse der Agglutinationsreaktionen für verschiedene Staphylokokken-Stämme bei Verwendung der polyklonalen Kaninchen-Antiseren.

Stamm	Koagulase	Protein-A	native Keime			autoklavierte Keime	
			Agglutination mit			Agglutination mit	
			0,85 % NaCl-Lsg	spezifischem Antiserum ¹	irrelevantem Serum	spezifischem Antiserum ¹	irrelevantem Serum
<i>S. aureus</i> MHI 304	+	kein	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i> MHI 337	+	mittel	-	+	-	+	-
<i>S. aureus</i> DSM 20372	+	hoch	(+)	+	(+)	+	(+)
<i>S. aureus</i> MHI 409	+	hoch	-	+	-	n.a. ²	n.a. ²
<i>S. aureus</i> DSM 20491	+	kein / mittel	-	+	-	+	-
<i>S. calnii</i> MHI 357	-	kein	-	-	-	-	-
<i>S. simulans</i> MHI 358	-	kein	-	-	-	-	-
<i>S. xylosus</i> MHI 362	-	kein	+	+	+	-	-

¹ gefälltes Antiserum des Kaninchens #71 (17. Abnahmewoche)

² n.a. = nicht auswertbar (Verklumpung der Keime während des Autoklavierens)

3.3.5.3.2.3 Immunfluoreszenz

Um die Bindung der generierten Antikörper an die Oberflächen intakter Keime nachzuweisen, wurde der Immunfluoreszenztest wie unter 3.2.4 beschrieben, analog zu den *B. cereus* Sporen, durchgeführt.

Die Reaktion des Kaninchenserums mit lebenden *S. aureus* Keimen konnte ebenfalls erfolgreich dargestellt werden. Abb. 25 zeigt fluoreszenzmarkierte *S. aureus*-Keime im Phasenkontrast bzw. nach Fluoreszenzinduktion. Ebenso wie bei den *B. cereus* Sporen prädestinierte die hohe Affinität der Kaninchenseren für vitale Keime diese Antikörper für den Einsatz in der Bioaffinitätsseparation.

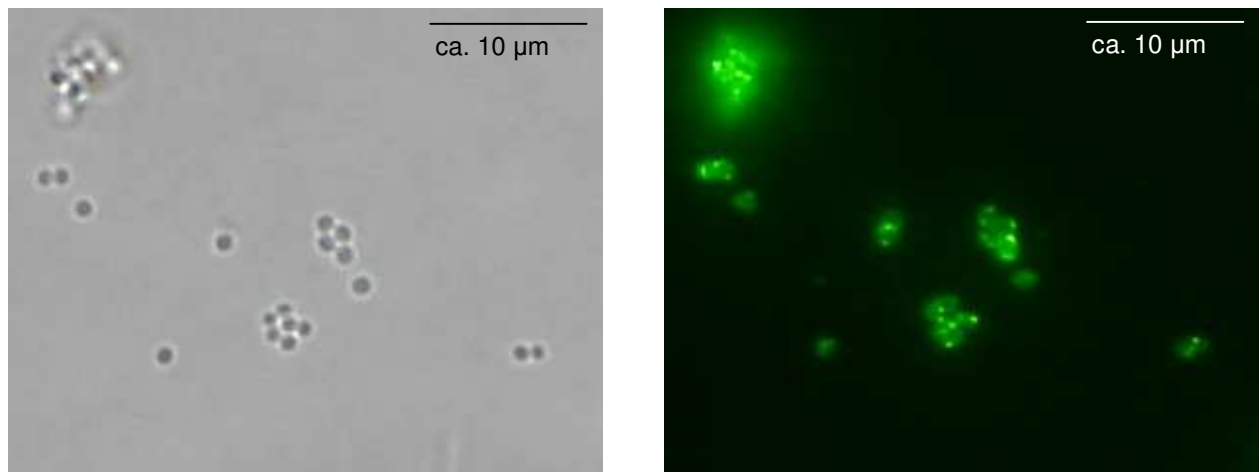


Abbildung 25: *S. aureus* Stamm DSM 20491 (Protein-A negativ) im Phasenkontrast und in der Immunfluoreszenz, markiert mit spezifischem Kaninchenserum (#71, 39. Abnahmewoche)

In orientierenden Versuchen unter Verwendung der gegen *S. aureus* gerichteten mAk (Tab. 14) konnte hingegen keine Bindung dieser Antikörper an die Keime mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, wobei die gegen Protein-A gerichteten Antikörper nicht überprüft wurden. Aufgrund der fehlenden Reaktion in der Immunfluoreszenz wurden die Zielantigene ebenfalls im Immunoblot untersucht. Die Präparation von Ribolysaten, die Auftrennung der Proteine und das Blotting erfolgte wie in 3.3.2.2, 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben.

Bei den überprüften antikörperhaltigen ZKÜ konnte nur mit dem mAk 1D7 eine eindeutige Reaktionsbande erhalten werden, die in Negativkontrollen nicht zu sehen war. Das

Molekulargewicht des Antigens wurde mit 39,8 kDa berechnet. Die entsprechenden Immunoblots sind in Abb. 26 dargestellt.

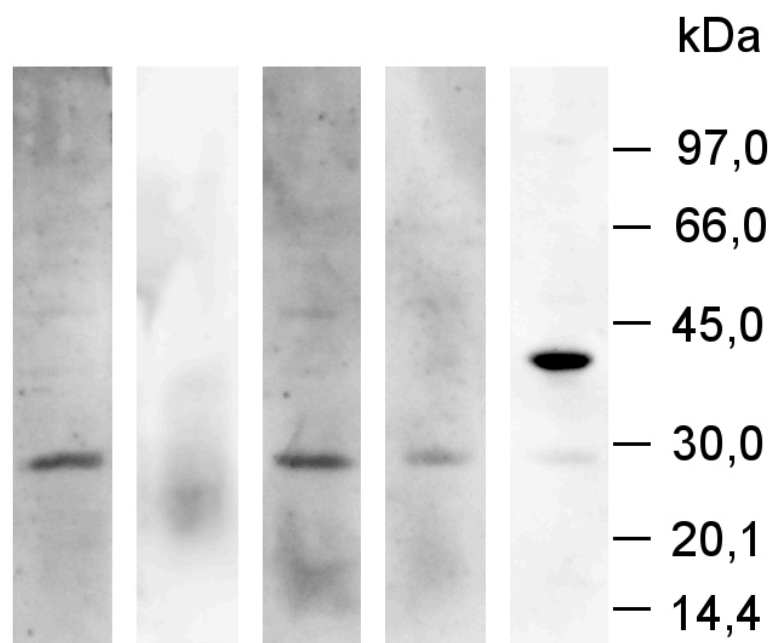


Abbildung 26: Immunoblots von mAk gegen *S. aureus* v.l.n.r.: Kontrollansatz, mAk 2B2, mAk 2C2, mAk 1G4, mAk 1D7; als Probe wurde Ribolysat des *S. aureus* Stammes DSM 20491 (Protein-A negativ) eingesetzt. Beim Kontrollansatz wurde der Blot nur mit dem peroxidasemarkierten Sekundärantikörper (Horse anti-Mouse IgG-HRP) beprobt.

3.3.6 Einsatz der Antikörper in monolithischen Bioaffinitätsanreicherungssäulen

3.3.6.1 Versuchsaufbau und Ablauf

Die monolithischen Bioaffinitätschromatographiesäulen wurden von Sonja Ott am Lehrstuhl für Analytische Chemie (Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie) der Technischen Universität München produziert. Die Anreicherung wurde wie in der Literatur beschrieben (PESKOLLER et al., 2009; OTT et al., 2011) durchgeführt. Hierzu wurde gefälltes Antiserum des Kaninchens #74 (Nachweis von *B. cereus* Sporen) bzw. #71 (*S. aureus*-Nachweis) kovalent an das monolithische Material gekoppelt. In Vorversuchen zur Aufkonzentrierung von *B. cereus* Sporen konnte gezeigt werden, dass bei einer Belegungsdichte von 1 mg gefälltem, polyklonalem Antiserum pro ml Säulenmaterial hohe Wiederfindungsraten für die in Puffer vorliegenden Keime erhalten wurden. Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit sollte die Aufkonzentrierung der Zielkeime aus 100 ml Magermilch überprüft werden. Dazu wurden mit verschiedenen Keimgehalten von *B. cereus* Sporen oder *S. aureus* ($10^1 - 10^4$ KbE/ml) angereicherte Proben bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 7 ml/min über die Säulen gegeben. Danach wurden die zurückgehaltenen Keime mit einem Glycin/HCl Elutionspuffer (pH 3) eluiert, wobei die Elution einmal in Fließrichtung der Probe und einmal entgegen der Fließrichtung mit jeweils 1 ml Puffer durchgeführt wurde. Die Eluate wurden sofort 1:1 mit Bicarbonatpuffer neutralisiert, um Schäden an den Keimen und Probleme im Nachweissystem zu vermeiden.

3.3.6.2 Anreicherung von *B. cereus* Sporen aus Magermilch

Zur quantitativen Auswertung der mit den monolithischen Säulen erzielten Anreicherung von *B. cereus* Sporen wurden die Keimgehalte in den jeweiligen Fraktionen (Durchlauf bzw. Eluat) mittels klassischer Plate Count-Methodik bestimmt (Tab. 17). Bei allen untersuchten Konzentrationsbereichen (10^1 - 10^4 KbE/ml bzw. 10^3 - 10^6 KbE/Lauf) von Sporen im Probenmaterial wurden zwischen 40 % und 60 % der eingesetzten Keime in den Eluaten nachgewiesen. Damit einhergehend wurde eine durchschnittliche Anreicherung der Keime im Eluat im Vergleich zur aufgetragenen Probe von Faktor 19,6 beobachtet. So wurden beispielsweise beim Auftrag von mit 10^3 KbE/ml kontaminierten Proben durchschnittlich 2×10^4 KbE/ml in den Eluaten wiedergefunden.

Tabelle 17: Überblick über die Sporenanreicherungsversuche (n = 3) aus 100 ml Magermilchproben mit monolithischen Säulen. Die Quantifizierung erfolgte durch klassische Plate Count-Methodik. Der Konzentrierungsfaktor wurde anhand der Keimdichte im Eluat im Vergleich zum Keimgehalt der aufgetragenen Probe berechnet. Die Summe der Prozentangaben von Durchlauf und Eluaten weicht aufgrund methodisch bestimmter Schwankungen bei der Keimzahlbestimmung von 100 % ab.

Keimgehalt der aufgetragenen Probe (KbE/ml)	Wiedergefundene Sporen (%)		Konzentrierungs- faktor [$\bar{X}(\pm s)$]
	Durchlauf [$\bar{X}(\pm s)$]	Eluate [$\bar{X}(\pm s)$]	
10^1	70,9 ($\pm 17,4$)	41,1 ($\pm 14,9$)	16,6 ($\pm 6,7$)
10^2	73,6 ($\pm 12,7$)	46,2 ($\pm 9,2$)	18,1 ($\pm 2,2$)
10^3	45,0 ($\pm 10,7$)	51,8 ($\pm 12,0$)	19,2 ($\pm 5,9$)
10^4	49,2 ($\pm 22,7$)	62,4 ($\pm 16,4$)	24,6 ($\pm 7,6$)

Um zu demonstrieren, dass mittels Bioaffinitätsanreicherung der Nachweis von *B. cereus* Sporen in Lebensmitteln innerhalb eines Arbeitstages realisiert werden kann, wurde neben der Auswertung mittels Plate Count-Verfahren als weiteres Nachweisverfahren eine real-time PCR etabliert. Dafür wurde DNA mit dem UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit nach der Anleitung des Herstellers aus jeweils 2 ml der sporenhaltigen Eluate extrahiert und mittels Vorwärts- und Rückwärtsprimern das bei 99,5 % aller *B. cereus* Stämme vorkommende *nheA*-Gen (WEHRLE et al., 2010) auf einem Light Cycler 2.0 nachgewiesen. Die verwendeten PCR-Primer wurden von der Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, synthetisiert. Die Methode erwies sich in mehreren Versuchen als zuverlässig und kompatibel mit den für die Elution verwendeten Puffern (Mischung aus Elutions- und Bicarbonatpuffer). Es wurde eine quantitative Nachweisgrenze von $2,5 \times 10^3$ KbE pro Probe erreicht. In Proben mit geringerer Konzentration gab es zwar nachweisbare Amplifikate mit passenden Schmelzkurven, diese ermöglichen aber nur noch eine qualitative Aussage zur Präsenz von *B. cereus* Sporen.

Abb. 27 zeigt die mittels der real-time PCR für *B. cereus* Sporen erhaltene Standardkurve, eine vergleichende Übersicht zu den bei der Bioaffinitätsanreicherung erhaltenen Ergebnissen basierend auf Plate Count-Methodik und real-time PCR zeigen Tab. 18 und Abb. 28. Im Bereich von 10^2 bis 10^4 KbE/ml im Probenansatz zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus beiden Nachweisverfahren. Beim Ansatz mit den niedrigsten Keimgehalten von 10^1 KbE/ml lieferte die real-time PCR allerdings für jedes der drei Eluate Ergebnisse im Bereich von 3×10^3 KbE und lag damit weit über der Zahl an Sporen, die überhaupt in den jeweiligen Versuchen eingesetzt worden waren. Im Gegensatz zu dieser Überschätzung des Keimgehaltes zeigte die Bestimmung mittels Plate Count einen lineareren Zusammenhang und besitzt im unteren Konzentrationsbereich der Proben somit größere quantitative Aussagekraft. Die Übereinstimmung der Ergebnisse und die Überschätzung niedriger Konzentrationen durch die real-time PCR wird besonders durch den Quotient der Ergebnisse in Tab. 18 verdeutlicht. Der Sandwich-EIA (3.3.5.2.1.2) wurde in diesen Untersuchungen nicht eingesetzt, da dieses Nachweisverfahren nicht die notwendige Selektivität ausschließlich für *B. cereus* Sporen aufwies.

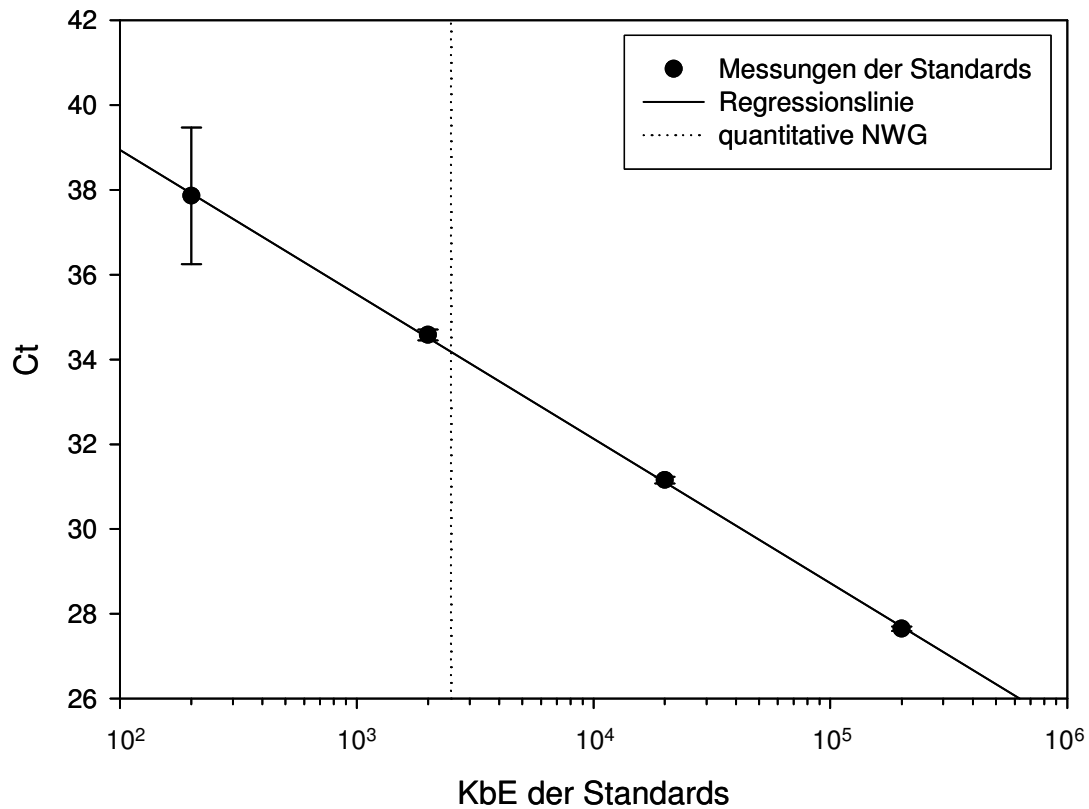


Abbildung 27: Standardkurve der real-time PCR zum Nachweis von *nheA*-Genen von *B. cereus*.

Tabelle 18: Mittels real-time PCR bzw. Plate Count-Verfahren nachgewiesene Keimgehalte in den bei der Bioaffinitätsanreicherung erhaltenen Eluaten.

Keimgehalt der aufgetragenen Probe (KbE/ml)	Real-time PCR (KbE/Eluat) [$\bar{x}(\pm s)$]	Plate Count (KbE/Eluat) [$\bar{x}(\pm s)$]	Quotient PCR / Plate Count
10^1	$3,3 \times 10^3 (\pm 1,8 \times 10^3)$	$2,7 \times 10^2 (\pm 1,1 \times 10^2)$	12,2
10^2	$4,9 \times 10^3 (\pm 1,5 \times 10^3)$	$2,2 \times 10^3 (\pm 6,6 \times 10^2)$	2,2
10^3	$1,5 \times 10^4 (\pm 2,0 \times 10^3)$	$2,8 \times 10^4 (\pm 5,9 \times 10^3)$	0,6
10^4	$2,1 \times 10^5 (\pm 5,4 \times 10^4)$	$2,8 \times 10^5 (\pm 6,9 \times 10^4)$	0,7

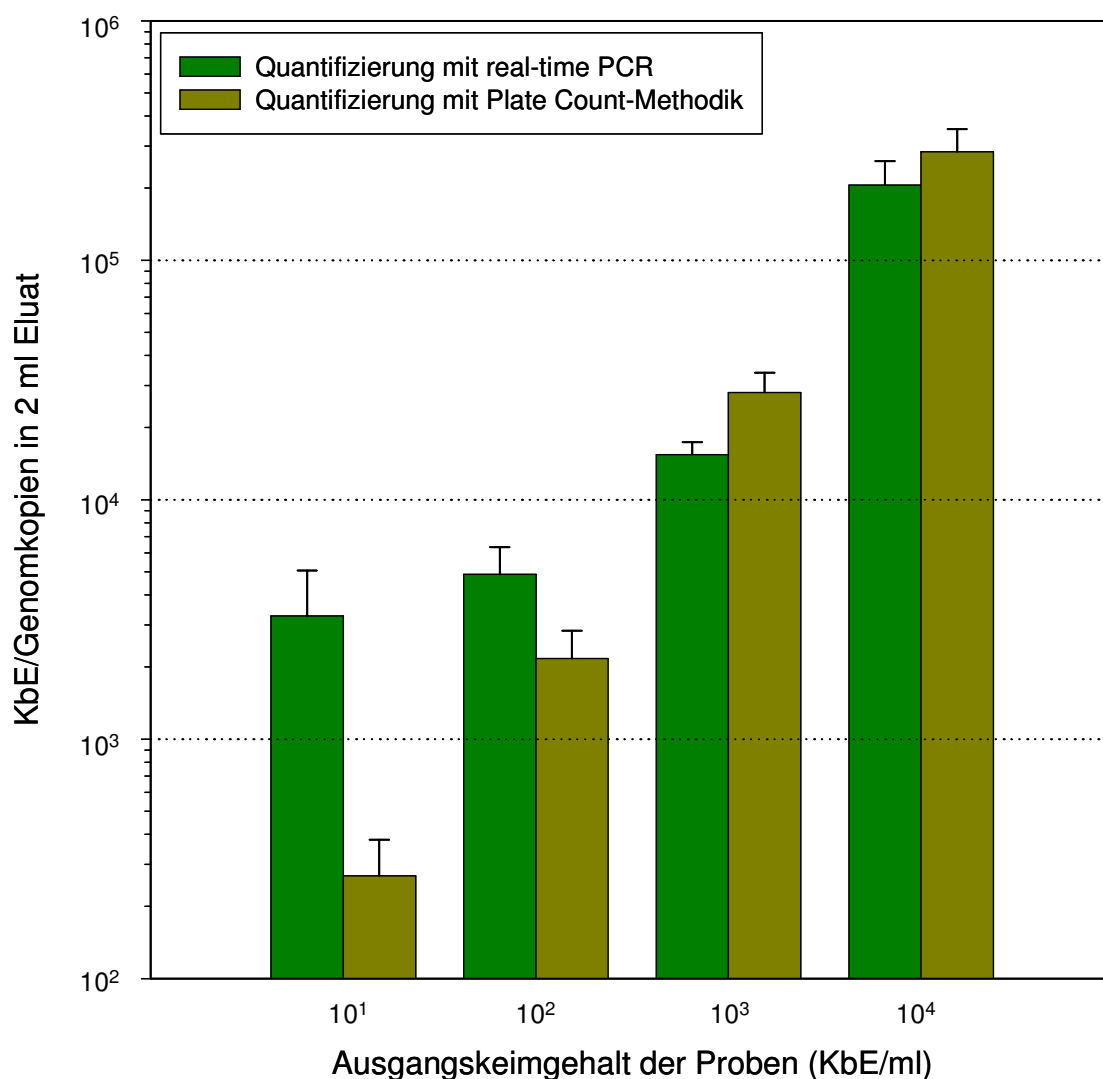


Abbildung 28: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Sporenanreicherung mit monolithischen Säulen.

3.3.6.3 Anreicherung von *S. aureus*

Trotz Variationen vieler Versuchsparameter (Beschichtung der Säulen mit unterschiedlichen Antiseren, Antikörperkonzentration zur Beschichtung der Säulen, getestete *S. aureus* Stämme, Konzentration der Bakterien, pH-Wert, Molarität und Zusammensetzung der Pufferlösungen, Fließgeschwindigkeit der Probe über die Säule, Temperatur der Probe) konnte für Protein-A negative *S. aureus* keine signifikante Anreicherung mittels Bioaffinität realisiert werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Interessanterweise wurden auch beim Protein-A positiven Stamm DSM 20372, der theoretisch aufgrund der Interaktion von Protein-A mit den Fc-Teilen der immobilisierten Antikörper zu einem hohen Prozentsatz an die monolithischen Säulen binden sollte, nur eine vergleichsweise geringe

Wiederfindungsrate von ca. 35 % erreicht – ein Hinweis darauf, dass zum Nachweis dieser Keimgruppe (Kokken) im Gegensatz zu den Sporen die Fluidmechanik der Monolithen noch weiter optimiert werden muss.

3.3.6.4 Überprüfung Sepharose-basierter Bioaffinitätsanreicherungssäulen für *S. aureus*

Aufgrund der schlechten Ergebnisse für die Aufkonzentrierung von *S. aureus* in den Versuchen mit den monolithischen Bioaffinitätsanreicherungssäulen wurden klassische, auf Sepharosegelen basierende Affinitätssäulensysteme eingesetzt, um die generelle Eignung der Antikörper, speziell gegen *S. aureus*, für diesen Anwendungszweck zu testen und die prinzipielle Funktionalität des Systems zu überprüfen.

Zur Herstellung des Säulenmaterials wurde 15 mg polyklonales Serum an 1 g CNBr-aktivierte Sepharose (GE Healthcare) nach Herstelleranleitung gekoppelt. Die für die Versuche verwendeten Säulen hatten ein Gesamtvolumen von ca. 700 µl.

In den Versuchen wurden native *S. aureus* und *S. aureus*-Ribolysate eingesetzt. Die Anzucht von *S. aureus* erfolgte wie in 3.3.1.2.2, die Herstellung der Ribolysate wie in 3.3.2.2 beschrieben. Beim Einsatz von Keimen in Lösung wurden Keimzahlen von 10^3 KbE/ml eingesetzt, bei *S. aureus* Ribolysat wurde eine 1:300-Verdünnung (entspricht einem Ausgangskeimgehalt von 10^8 KbE/ml) verwendet, die zuvor im Sandwich-EIA als geeignete Konzentration ermittelt worden war.

Vor Verwendung wurden die Sepharosesäulen mit 5 ml PBS gespült, um in der Säule befindliches Natriumazid zu entfernen, da dieses als Konservierungsmittel die Keimzahlbestimmungen der Probenlösungen stören würde. Dann wurden die Antigene (20 ml Lösung bei nativen Keimen bzw. 5 ml beim Ribolysat) mit einer Geschwindigkeit von 2-3 ml/min über die Säulen gegeben, wobei die Durchläufe aufgefangen wurden. Nach dem Probenauftrag wurden die Säulen nochmals mit 5 ml PBS gespült. Anschließend folgte die Elution mit zwei mal je 5 ml Glycin/HCl-Puffer (pH 3), der auch für die monolithischen Säulen verwendet wurde. Die Eluate wurden sofort nach deren Gewinnung 1:1 mit Bicarbonatpuffer neutralisiert, um zu verhindern, dass der niedrige pH-Wert eine Inaktivierung der Keime und damit eine negative Beeinflussung der Keimzahlbestimmung zur Folge haben könnte.

Die Quantifizierung der Probeneinsätze, der Durchläufe und der Eluate erfolgte im Falle von nativen Keimen mittels klassischem Plate Count-Verfahren, bei dem Verdünnungsreihen der Proben auf nicht selektive Nährböden ausgebracht, über Nacht bebrütet und am Folgetag ausgezählt werden. Die Ribolysate von *S. aureus* wurden im Kaninchenserum-Sandwich-EIA (3.3.5.3.1.2) quantifiziert.

Um prinzipiell die Bindung von Staphylokokken an Sepharose-basiertes Gelmaterial zu überprüfen, wurde die Interaktion von Protein-A mit IgG-Antikörpern genutzt. Zu diesem Zweck wurde ein irrelevanter monoklonaler IgG-Antikörper an CNBr-aktivierter Sepharose immobilisiert. Über dieses Säulenmaterial wurde dann ein Protein-A positiver *S. aureus*-Stamm, DSM 20372, gegeben. Die Quantifizierung der Keimzahlen in den verschiedenen Fraktionen zeigte, dass ca. 60 % der *S. aureus* Keime an die Festphase der Säule gebunden hatten, während ca. 40 % des Materials im Durchlauf sowie den Waschfraktionen nachgewiesen wurde, ein Hinweis darauf, dass die durch Protein-A vermittelte Bindung von *S. aureus* an immobilisierte IgG-Antikörper im Sepharosesäulen-Modell deutlich besser als bei den Monolithen funktioniert.

Im nächsten Schritt wurde die Interaktion von Protein-A negativen *S. aureus* mit den spezifischen Kaninchenserum überprüft. Dazu wurde jeweils Gelmaterial mit polyklonalen Antikörpern der Kaninchen #71 bzw. #75 beschichtet, und diese mit dem *S. aureus*-Stamm DSM 20491 (Protein-A negativ) getestet. Unerwarteterweise konnten jedoch in beiden Fällen keine nennenswerten Mengen der Keime in den Eluatfraktionen nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass die Antikörper bei der Immobilisierung an das Gelmaterial inaktiviert wurden, da die kovalente Bindung der Antikörper an das CNBr-aktivierte Gelmaterial zufällig erfolgt.

Um die Bindungsfähigkeit der polyklonalen Antikörper, die an der Sepharosesäule immobilisiert wurden, zu überprüfen, wurde die mit Kaninchenantikörpern des Tieres #71 beschichtete Säule nochmals verwendet, und als Antigen Protein-A negatives *S. aureus*-Ribolysat, das sich im EIA als reaktivste Antigenpräparation gezeigt hatte, eingesetzt. Die Proben wurden hier, da es sich bei Ribolysat nicht mehr ausschließlich um lebensfähige Keime handelt, nicht mittels Plate Count-Verfahren, sondern mittels Kaninchenserum Sandwich-EIA (3.3.5.3.1.2) quantifiziert. Mittels EIA wurden über 40 % des wiedergefundenen Materials in der Eluatfraktion nachgewiesen, ein Beleg dafür, dass zumindest ein Teil der gebundenen Antikörper aktiv ist.

Um die Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse weiter einzugrenzen, wurde ein alternativer Ansatz überprüft, bei dem die IgG-Fraktion der spezifischen Kaninchenserum bei

Erhalt der immunologischen Aktivität reversibel an ein mit Protein-A beschichtetes Gelmaterial immobilisiert wurde. Als Probe wurde ein Protein-A negativer *S. aureus* Keim (DSM 20491) eingesetzt. Auch in diesem Versuch wurden jedoch nur knapp 10 % der aufgetragenen Keime in der Eluatfraktion nachgewiesen.

Die in Tab. 19 zusammengefassten Versuche, sowie die Ergebnisse der Agglutinations-Reaktionen (3.3.5.3.2.2) weisen darauf hin, dass die in den Seren nachweisbare Antikörperpopulation gegen *S. aureus* Zellwandstrukturen (z.B. Peptidoglycane bzw. Teichonsäure) v.a. vom IgM-Subtyp dominiert wird. Diese Antikörper weisen jedoch eine vergleichsweise geringe Stabilität auf und wurden offensichtlich bei der Immobilisierung an die monolithischen Bioaffinitätsäulen bzw. den Sepharose-Gelen inaktiviert. Demzufolge konnten in den Eluaten nur geringe Wiederfindungsraten für Protein-A negative *S. aureus* bestimmt werden.

Tabelle 19: Übersicht über Versuche mit Sepharose-basierten Bioaffinitäts-anreicherungsäulen

Immobilisiertes Material	Probe	Fraktion	% der wieder-gefundenen Probe
irrelevanter IgG-Antikörper	<i>S. a.</i> DSM 20372 (Prot.-A positiv)	Durchlauf	39,2
		Eluat	60,8
Kaninchenserum #71	<i>S. a.</i> DSM 20491 (Prot.-A negativ)	Durchlauf	98,6
		Eluat	1,4
Kaninchenserum #75	<i>S. a.</i> DSM 20491 (Prot.-A negativ)	Durchlauf	96,2
		Eluat	3,8
Protein-A, dann Kaninchenserum #75	<i>S. a.</i> DSM 20491 (Prot.-A negativ)	Durchlauf	90,7
		Eluat	9,3
Kaninchenserum #71	<i>S. a.</i> DSM 20491 Ribolysat (Prot.-A negativ)	Durchlauf	55,7
		Eluat	44,3

4 Diskussion

Aufgrund ihres pathogenen Potentials und des häufigen Vorkommens von *B. cereus* und *S. aureus* stellen diese beiden Keime wichtige Faktoren in der Routineuntersuchung von Lebensmitteln dar. In den europäischen Mitgliedsstaaten sind in der VO (EG) Nr. 2073/2005 Staphylokokken-Enterotoxine als Lebensmittelsicherheitskriterium und koagulasepositive Staphylokokken als Prozesshygienekriterium festgeschrieben. Ebenfalls als Prozesshygienekriterium werden präsumtive *B. cereus* in der VO (EG) Nr. 1441/2007 aufgeführt. Gerade in der Milchindustrie, in der große Chargen von zehntausenden von Litern verarbeitet werden, birgt eine Kontamination mit diesen Bakterien nicht nur eine gesundheitliche Gefahr für eine große Anzahl an Verbrauchern, sondern auch im Falle von Verschleppung der Krankheitserreger in eine Vielzahl von Produkten ein enormes Schadenspotential für die Molkereien (VELTHUIS et al., 2009; VELTHUIS et al., 2010). Rückrufaktionen schaden nicht nur dem Ruf eines Herstellers, sondern verursachen, ebenso wie die unschädliche Beseitigung kontaminierter Lebensmittel, hohe Kosten, die teilweise bis weit in den zweistelligen Millionenbereich gehen (SKEES et al., 2001). Um diese Belastungen für die Industrie zu vermeiden, ist es wichtig, relevante Mikroorganismen schon möglichst früh im Herstellungsprozess der Waren nachweisen zu können. Die derzeitigen Standardmethoden (2.1.4 bzw. 2.2.4) sehen allerdings langwierige Anzuchtverfahren vor, die eine notwendige Entscheidung über die Produktsicherheit verzögern. Um einen schnelleren Nachweis zu ermöglichen, wäre es wünschenswert, die Bakterien aus Proben mit niedriger Keimzahl ohne Anreicherungsschritt so weit zu konzentrieren, dass mit den verfügbaren Analysemethoden die Keime direkt nachweisbar sind. Für diese Fragestellung sind immunchemische Verfahren wie die Bioaffinitätschromatographie bestens geeignet, allerdings unter der Voraussetzung, dass spezifische Antikörper für die jeweiligen Mikroorganismen zur Verfügung stehen.

4.1 Generierung von Antikörpern

Im Hinblick auf den geplanten Einsatz der entwickelten mAk in EIAs und in der bioaffinitätschromatographischen Konzentrierung der Zielmikroorganismen wurden die nach der Zellfusion erhaltenen ZKÜ gezielt auf Antikörper vom IgG-Subtyp gescreent, da sich diese Antikörper zum einen erfahrungsgemäß durch eine höhere Stabilität auszeichnen und zum anderen relativ einfach aufzureinigen sind. In Abhängigkeit vom verwendeten Immunogen wurden hierbei allerdings unterschiedliche Erfahrungen gemacht: Sporen von *B. cereus* und die Ghosts-Präparationen von *S. aureus* resultierten v.a. in Antikörpern vom IgM-Subtyp, während gegen mit Paraformaldehyd inaktivierte Präparationen von vegetativen *B. cereus* und *S. aureus* eine breite Palette von IgG-Antikörpern mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität erhalten wurde.

Die sechs in der vorliegenden Arbeit gewonnenen mAk gegen **vegetative Formen von *B. cereus*** sind alle vom Subtyp IgG. Zur Immunisierung wurden Mischpräparationen aus zwei unterschiedlichen Stämmen, einem Bildner von Diarrhö-Toxinen (DSM 4384) und einem Typstamm (DSM 31), eingesetzt. Dieser duale Ansatz lieferte Antikörper unterschiedlicher Spezifität, wobei mit einer Ausnahme alle mAk nur mit Stämmen von *B. cereus* und der Cereus-Gruppe reagierten. Nur ein mAk, 2C10, zeigte auch Reaktionen mit 3 Vertretern von *B. stearothermophilus* (Tab. A3). Um die Intraspezies-Reaktivität der mAk umfassend zu charakterisieren wurde eine im Vergleich zu anderen bislang beschriebenen Ansätzen sehr umfangreiche Stammsammlung von 107 Bazillenstämmen eingesetzt. Dies ist deshalb besonders wichtig, weil mAk naturgemäß nur ein Epitop auf dem jeweiligen Zielantigen erkennen. Bei Proteinen umfasst dieses Epitop etwa 4-8 Aminosäuren. Eine hohe Variabilität in dieser Sequenz bei den verschiedenen Bakterienstämmen limitiert die Intraspezies-Spezifität des Antikörpers und kann im Extremfall dazu führen, dass der mAk nur mit dem zur Immunisierung eingesetzten Bakterienstamm reagiert (WOLFERTSTETTER, 1999). Dies war jedoch bei den gegen vegetative Formen von *B. cereus* entwickelten mAk nicht der Fall. mAk 2E3 reagierte z.B. mit 71 von 84 Vertretern von *B. cereus*, 2 von 9 Vertretern der Cereus-Gruppe (2x *B. thuringiensis*), hingegen aber nicht mit anderen Bazillen (n = 14; Tab. A1, A2 und A3). Die breite Reaktivität der mAk spricht für hochkonservierte antigene Epitope, die bei verschiedenen Stämmen vegetativer *B. cereus* vorkommen, wobei dennoch eine gewisse Variabilität zwischen den einzelnen mAk festgestellt wurde. So zeigten beispielsweise einige der mAk nur mit einem der beiden als Immunogen verwendeten Bazillenstämmen eine Reaktion. Trotz der breiten Reaktivität der

mAk scheint es im Hinblick auf die Entwicklung eines immunchemischen Testsystems sinnvoll, eine Mischung mehrerer, in ihrer Selektivität unterschiedlicher mAk einzusetzen, um möglichst viele unterschiedliche Stämme von *B. cereus* erfolgreich nachweisen zu können. Unklar blieb, warum die mAk nur im indirekten EIA, nicht aber im Sandwich-EIA oder in der Immunfluoreszenz reagierten, wobei andere Arbeiten zu mAk gegen Gram-positive Bakterien auch dieses Problem beschreiben. So wurde bei LIN et al. (2006) nur bei zwei von 35 etablierten mAk gegen *Listeria monocytogenes* eine Reaktion mit ganzen Zellen in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Untersuchungen zur Herstellung von mAk gegen vegetative Formen von *B. cereus* wurden auch von CHARNI et al. (2000) publiziert. Die gewonnenen zwei mAk wurden ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit anhand einer Stammbibliothek, die 21 *B. cereus*-Stämme, 5 Stämme der Cereus-Gruppe, 7 andere Bazillenstämme und 7 gänzlich andere Bakterienspezies enthielt, mittels indirekter EIAs untersucht. Die dabei erhaltenen Reaktionsmuster sind denen ähnlich, die in der vorliegenden Arbeit bei den sechs gewonnenen mAk gegen vegetative Formen von *B. cereus* gefunden wurden. Hohe Reaktivität wurde nur mit Stämmen aus der Cereus-Gruppe festgestellt, Bazillen-Spezies aus anderen morphologischen Gruppen reagierten hingegen nicht. Auch die Molekulargewichte der Zielantigene lagen in einem ähnlichen Bereich bei 22 und 58 bzw. 62 kDa. Im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen konnte von CHARNI et al. (2000) mit den mAk ein Sandwich-EIA etabliert werden, als Nachweisgrenze wurden 10^2 KbE/ml Anreicherungsmedium angegeben.

Gegen **Sporen von *B. cereus*** stellte es sich als äußerst schwierig dar, mAk vom IgG-Subtyp zu generieren. Dennoch wurde im Hinblick auf die spätere Anwendung, gerade auch in der Bioaffinitätschromatographiesäule, der Fokus auf mAk diesen Subtyps gelegt. Als Immunogen kamen inaktivierte Sporen der *B. cereus* Stämme DSM 4312, der emetisches Toxin bildet, DSM 4384, der Diarrhö-Toxine bildet, und ein Isolat aus Lebensmitteln, MHI M1, zum Einsatz. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, 2 mAk vom IgG-Subtyp zu gewinnen. mAk 1F12 ist hoch selektiv für *B. cereus*, im indirekten EIA reagierte er mit 46 von 77 Stämmen und zeigte keine Reaktion mit anderen Vertretern der Cereus-Gruppe oder anderen Bazillenspezies. Der zweite gewonnene mAk, 2E7, reagierte hingegen mit 50 von 77 Stämmen *B. cereus*, aber auch mit zwei Stämmen *B. mycoides* und einem Stamm *B. licheniformis*. Neben dieser unerwünschten Kreuzreaktivität zeichnet sich dieser mAk durch eine höhere Affinität aus. So konnte mit dem mAk 2E7 bei einigen *B. cereus* Stämmen noch weniger als 10^5 KbE/ml im indirekten EIA nachgewiesen werden, während die Reaktivität des mAk 1F12 im Bereich von 10^6 - 10^8 KbE/ml lag (Tab. A4, A5 und A6). Beide

Antikörper zeigten allerdings keine Reaktionen in der Immunfluoreszenz. Auch einige der von WALPER et al. (2012) beschriebenen Einzeldomänenantikörper (sdAk) gegen das sporenssoziierte Protein EA1 zeigten nur Reaktionen mit erhitzten und danach ultraschallbehandelten Sporen, ein Hinweis darauf, dass das von diesen Antikörpern erkannte Epitop auf intakten Sporen nicht zugänglich ist. Orientierende Versuche mit ähnlichen Sporenpräparationen führten jedoch in den eigenen Untersuchungen zu keiner signifikanten Verbesserung der Nachweisbarkeit mittels EIA bzw. Immunfluoreszenz (Ergebnisse nicht dargestellt). Somit bleibt unklar, ob die fehlende Reaktivität der mAk mit intakten Sporen in der Immunfluoreszenz auf die mangelnde Präsentation des Zielepitops zurückzuführen ist, oder ob die mAk (zumindest mAk 1F12, der im Immunoblot positiv reagierte) mit einem nichtsporenspezifischen Protein von *B. cereus* reagieren, das ähnlich wie das EA1-Protein an die Oberfläche der Sporen angelagert ist. Da bei der Durchführung der Immunfluoreszenz mehrere Waschschrirte zur Anwendung kommen, ist es durchaus möglich, dass hierbei diese locker angelagerten Proteine abgewaschen werden und daher keine Reaktivität des Antikörpers mehr mit den Sporen nachweisbar ist. Zur Klärung dieser offenen Fragen wäre die Identifizierung des von mAk 1F12 erkannten 21 kDa-Proteins wünschenswert. Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit gemachten Erfahrungen ist es zudem im Hinblick auf die Generierung weiterer mAk gegen Sporen von *B. cereus* sicherlich sinnvoll, sowohl zur Immunisierung, als auch zum Screening intensiv gewaschene ($\geq 10x$) Sporenpräparationen einzusetzen, um diese an die Sporenoberfläche locker angelagerten Proteine zuverlässig und vollständig zu entfernen und somit die oben skizzierte Problematik zu umgehen. KUEHN et al. (2009) produzierten mAk gegen Sporen von *B. anthracis* und stießen auf ähnliche Probleme bei der Generierung von mAk vom IgG-Subtyp: Nach Immunisierung mit inaktivierten Sporen konnte nur ein einziger mAk vom Subtyp IgM etabliert werden. IgG-Antikörper wurden hingegen nach Immunisierung mit Einzelkomponenten des Exosporiums von *B. anthracis* gewonnen. QUINLAN & FOEGEDING (1997) gelang es, 2 mAk vom IgG-Subtyp gegen *B. cereus* Sporen zu generieren. In einem Screening mit 5 weiteren Bazillenstämmen wurden Kreuzreaktionen mit Sporen von *B. megaterium* und *B. subtilis* subsp. *globigii* festgestellt.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die im Kaninchen induzierten polyklonalen Antikörper die breiteste Reaktivität mit den getesteten Bazillen (Tab. A4, A5 und A6). Alle 77 eingesetzten *B. cereus* Stämme wurden erkannt, sowie die vier weiteren Vertreter der *Cereus*-Gruppe und zwei der drei anderen Bazillenspezies. Die Antiseren zeichneten sich zudem

durch eine sehr hohe Sensitivität aus, für die zur Immunisierung eingesetzten Stämme konnten im indirekten EIA Nachweisgrenzen von $< 10^5$ KbE/ml erreicht werden.

Bei der Herstellung von Antikörpern gegen *S. aureus* muss berücksichtigt werden, dass ein Großteil der pathogenen Stämme Protein-A exprimiert, das an Fc-Teile von Immunglobulinen bindet (LINDMARK et al., 1983; ATKINS et al., 2008). In einer Untersuchung von SPIKA et al. (1981) wurde der Protein-A Gehalt von 12 *S. aureus* Stämmen bestimmt, wobei Werte zwischen 0,04 und 5,0 ng pro 10^6 Bakterien ermittelt wurden. Stämme galten als Protein-A reich, wenn sie mehr als 0,625 ng pro 10^6 Bakterien enthielten. Die Bindung von Immunglobulinen an Protein-A positive *S. aureus* erschwert zum einen den Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *S. aureus* Oberflächenstrukturen und ist zum anderen natürlich besonders problematisch, wenn Protein-A-spezifische Antikörper nachgewiesen werden sollen. Um diese Problematik zu umgehen wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen inaktiviertes Protein-A (3.3.2.3) als Antigen im EIA eingesetzt und zum anderen wurden Protein-A positive *S. aureus* Stämme vor Einsatz in den Testsystemen mit unspezifischem Kaninchenserum abgesättigt.

Zur Gewinnung von polyklonalen Antiseren wurden Kaninchen mit ganzen, inaktivierten Keimen immunisiert, ein Vorgehen, das in der neueren Literatur selten zu finden ist, vielmehr werden isolierte oder rekombinant hergestellte Zelloberflächen-Membranproteine oder Peptidoglykanstrukturen eingesetzt (HALL et al., 2003; KIM et al., 2012; SANDHU et al., 2012). Um eine breite Reaktivität der Seren zu gewährleisten und so sicherzustellen, dass bei Untersuchungen von Lebensmittelproben möglichst alle Stämme von *S. aureus* detektiert werden können, wurden in der vorliegenden Arbeit heterogene Keimpräparationen eingesetzt, die sowohl Protein-A positive bzw. negative Referenzstämme (DSM 20372 bzw. DSM 20491), als auch Isolate aus Lebensmitteln (MHI 379 bzw. MHI 409) enthielten. Das polyklonale Kaninchenserum, das auf diese Weise gewonnen wurde, reagierte mit allen 94 Vertretern der KPS, aber auch mit 14 der 17 untersuchten KNS. In der Immunfluoreszenz wurde die Reaktion mit intakten *S. aureus* Keimen nachgewiesen. Bei der Immunisierung von Mäusen wurden dagegen mehrere Immunisierungsstrategien verfolgt. Aus den Zellfusionen mit den Mäusen, die mit Lysostaphin-Überständen (3.3.1.3.2) immunisiert wurden, konnte mit dem mAk 1E9 ein besonders interessanter mAk gewonnen werden. Er zeigte sich spezifisch für Protein-A, in indirekten EIAs mit inaktiviertem Protein-A als Beschichtungsantigen konnten weniger als 2 ng/ml nachgewiesen werden. Bei den Untersuchungen der Stammbibliothek reagierten 74 von 87 *S. aureus* Stämmen positiv. Insgesamt umfasste die Stammbibliothek 111 Staphylokokkenstämme, davon wurden

aufgrund der Reaktivität in einem irrelevanten EIA 64,9 % als Protein-A positiv und 35,1 % als negativ eingestuft (Tab. A7 und A8). Der mAk 1E9 erkannte 83,8 % aller Stämme richtig als Protein-A positiv oder negativ, nur bei 6,3 % der Stämme wurden falsch negative bzw. bei 9,9 % falsch positive Ergebnisse – bezogen auf die präsumtive Expression von Protein-A – erhalten. Von den aus den Immunisierungen mit ganzen, inaktivierten Keimen gewonnenen sechs mAk vom Subtyp IgG war besonders der mAk 2C2 interessant, der eine 100 %ige Selektivität für *S. aureus* aufwies und weder mit anderen KPS, noch mit KNS reagierte (Tab. A7 und A8). Die einzigen vermeintlichen KNS, die eine Reaktion zeigten, waren Problemstämme aus der mikrobiologischen Abteilung des Institutes (Tab. A8), die aufgrund unklarer Befunde in den biochemischen und mikrobiologischen Differenzierungstests nicht eindeutig einer bestimmten Staphylokokken-Spezies zuzuordnen sind, und die entsprechend nicht in die Auswertung mit einfließen können. Die Frage nach dem Zielantigen des mAk 2C2 ist nicht abschließend geklärt. Da der mAk keine Reaktion im Immunoblot zeigte, liegt die Vermutung nahe, dass es sich entweder um ein diskontinuierliches Epitop handelt, dessen Konformation wichtig für die Bindung ist, aber bei der Probenaufbereitung für den Immunoblot denaturiert wurde, oder dass es sich nicht um ein Protein handelt, sondern um einen anderen Bestandteil der Zellwand von *S. aureus*, wie z.B. ein Peptidoglykan oder Teichonsäure. Die Etablierung der Zelllinie, die den mAk 2C2 produziert, erfolgte zu einem sehr späten Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit, so dass die Einsetzbarkeit des Antikörpers für die Bioaffinitätschromatographie nicht mehr überprüft werden konnte. Andere bislang in der Literatur beschriebene mAk zum Nachweis von *S. aureus* zeigen hingegen eine zu hohe Selektivität, da sie meistens gegen spezifische *S. aureus* Membranproteine oder andere Oberflächenstrukturen hergestellt wurden.

So wurde z.B. ein mAk gegen den Clumping Factor A von *S. aureus* zum Einsatz als Injektionstherapeutikum entwickelt (HALL et al., 2003; PATTI, 2004; DOMANSKI et al., 2005; JOHN, 2006). Aufgrund seiner Fähigkeit, die Bindung von Fibrinogen an Clumping Factor A zu inhibieren wurde der mAk selektiert und mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie gegen Referenzstämme von *S. aureus* getestet, wobei zwischen 33,21 % und 97,31 % aller gezählten Bakterien erfolgreich fluoreszenzmarkiert werden konnten. Bei HALL et al. (2003) reagierte der mAk mit allen klinischen Isolaten (n = 21) von *S. aureus*. Allerdings konnte BECKER et al. (1989) nur bei 44,2 % aller untersuchten *S. aureus* Stämme aus Rohmilch (n = 387) den Clumping Factor A nachweisen. Das hohe Vorkommen des Clumping Factor A in klinischen Isolaten ist wahrscheinlich Resultat eines Selektionsdrucks für dieses Pathogenitätsmerkmal der Keime, der in dieser Form nicht in

Lebensmitteln herrscht. Ein weiteres Ziel für Antikörper in Nachweisverfahren und Infektionstherapie ist Protein-A (ESTEBAN-FERNÁNDEZ DE ÁVILA et al., 2012; KIM et al., 2012). Bei KIM et al. (2012) wurden zur Herstellung von mAk gegen Protein-A Mäuse mit rekombinantem SpA_{KKAA}, einem Derivat von Protein-A, das nicht als Superantigen wirkt, immunisiert. Es wurden drei mAk gewonnen, aber keine weiteren Untersuchungen zur Selektivität oder zur Sensitivität gegenüber *S. aureus*, anderen KPS oder KNS durchgeführt. ESTEBAN-FERNÁNDEZ DE ÁVILA et al. (2012) beschreibt einen amperometrischen immunomagnetischen Sensor, der in fettarmer Milch 1 KbE *S. aureus* pro ml nachweisen können soll, obwohl das Volumen, das tatsächlich in den Tests eingesetzt wurde, nur bei 50 µl lag. Diese Diskrepanz führten die Autoren darauf zurück, dass die Proben vor Einsatz im Testsystem einer Ultraschall-Behandlung unterzogen wurden. Dabei werden die Zellen zerstört und Oberflächenbestandteile – wie das Protein-A – freigesetzt. Um auf diese Weise allerdings noch eine quantitative Aussage über den Ausgangsgehalt der Probe machen zu können, müsste es sich um genau definierte und mit einer Standardkurve kalibrierte Stämme von *S. aureus* handeln, da unterschiedliche Stämme unterschiedliche Mengen an Protein-A enthalten. So konnte SPIKA et al. (1981) stark variierende Protein-A Konzentrationen von 0,04-5,0 ng (bezogen auf 10⁶ Keime) nachweisen, das entspricht einem Unterschied von Faktor 125. In Kombination mit dem extrem kleinen Probenvolumen dürfte die Nachweisgrenze von 1 KbE/ml nur schwer in der Praxis nachvollziehbar sein. Abgesehen davon gibt es sowohl Daten aus der Literatur, als auch der vorliegenden Arbeit, die belegen, dass nicht alle Stämme der KPS aus Lebensmittelproben Protein-A exprimieren. So fand KRONVALL et al. (1971) Protein-A bei 90 % der untersuchten *S. aureus* Stämme (n = 156), von den KPS in der vorliegenden Arbeit (n = 94) waren nur 74,5 % Protein-A positiv. WAGSTAFFE et al. (2012) produzierten bispezifische mAk, die sowohl an das *S. aureus* Enzym Thermonuklease (TNase), als auch an Fluorophore oder deren Trägermoleküle banden und setzten diese in einem neuartigen Fluoreszenzimmunsensor ein. Der Nachweis von TNase in einem Lebensmittel ist allerdings nur ein indirekter Hinweis darauf, dass die Probe einmal KPS enthalten haben könnte, und gilt nicht als Nachweis für KPS (BECKER & MÄRTLBAUER, 2011). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen polyklonalen Kaninchenserum und die mAk 1E9 und 2C2 zeigten dagegen Reaktivität mit fast allen bzw. allen *S. aureus* Stämmen der Stammbibliothek (n = 87) und bieten sich somit aufgrund ihrer breiten Spezifität zum Nachweis von *S. aureus* aus Lebensmitteln an.

4.2 Nachweissysteme

EIA-Systeme zum schnellen Nachweis von Bakterien und anderen Antigenen sind aufgrund der einfachen Anwendung und geringem zeitlichen Aufwand weit verbreitet. Ihr größtes Problem besteht in relativ hohen Nachweisgrenzen, wobei diese durch spezielle Verfahren, wie den Einsatz von chemilumineszierendem statt chromogenem Substrat, verbessert werden können. Im indirekten EIA konnten mit den mAk gegen vegetative Formen von *B. cereus*, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnen wurden (3.3.5.1), bis zu $4,0 \times 10^4$ KbE/ml nachgewiesen werden. Der luminometrische Sandwich-EIA zum Nachweis von *B. cereus* Sporen basierend auf polyklonalen Kaninchenseren (3.3.5.2.1.2) erwies sich als hoch sensitiv, die Nachweisgrenze des Verfahrens lag bei $5,4 \times 10^3$ KbE/ml. Allerdings reagierten auch Sporen von allen untersuchten Vertretern der *Cereus*-Gruppe ($n = 4$) und zwei von drei anderen Bazillenstämmen im Sandwich-EIA positiv. Die Testempfindlichkeit des entwickelten Sandwich-EIAs liegt im oberen Bereich der bislang zum Nachweis von *Bacillus* Sporen publizierten EIAs (HOILE et al., 2007; KUEHN et al., 2009; WANG et al., 2009a; GÓMEZ DE LA TORRE et al., 2012). Die Angaben differieren hierbei zwischen 10^3 und 10^6 KbE/ml. Auch die Selektivität des Nachweises ist mit anderen Arbeiten vergleichbar, in denen ebenfalls Kreuzreaktionen innerhalb der *Cereus*-Gruppe beschrieben wurden (KING et al., 2003; KUEHN et al., 2009; TAMBORRINI et al., 2010; WALPER et al., 2012).

Neben der Sensitivität eines Nachweises spielt die Selektivität für den gewünschten Analyten eine übergeordnete Rolle für die Anwendung eines Testsystems in der Praxis. Da der Sandwich-EIA nicht den spezifischen Nachweis von *B. cereus* erlaubte, wurde im Hinblick auf die Erstellung eines auf Bioaffinitätschromatographiesäulen basierenden Schnellnachweises dieses Keimes aus Lebensmitteln eine real-time PCR als alternatives, ebenso sensitives, schnelles und selektiveres Verfahren etabliert. Die real-time PCR benötigt zwar einen höheren Geräteaufwand als immunchemische Verfahren, erreicht aber in der Regel Nachweisgrenzen, die denen eines EIA überlegen sind. Die Selektivität kann bei sorgfältiger Auswahl oder Entwicklung von Primerpaaren sehr genau eingestellt werden. Bei *Bacillus* Sporen besteht die erste Schwierigkeit darin, ein effektives Aufschlussverfahren für die robusten Dauerstadien zu finden, das auch kompatibel zur jeweiligen Probenmatrix sein muss (DAUPHIN et al., 2009; GULLEDGE et al., 2010; ROSE et al., 2011; WIELINGA et al., 2011). Nach der Extraktion der DNA ist die weitere Vorgehensweise identisch zu vegetativen Formen der Bazillen oder gänzlich anderen Bakterien. Beachtliche Nachweisgrenzen werden in der Literatur beschrieben: Mittels PCR konnte RANIERI et al.

(2012) $3,25 \times 10^1$ KbE/ml *Paenibacillus* spp. aus Rohmilchproben nachweisen. JAIN et al. (2012) setzte eine real-time PCR ein, um *B. anthracis* Sporen in Bodenproben und Talkumpuder nachzuweisen. Positive Resultate wurden hier für jeweils 10^3 und 10^2 Sporen in 0,1 g Probe erreicht. Noch niedrigere Nachweisgrenzen wurden von MARTINEZ-BLANCH et al. (2009) beschrieben, die eine real-time PCR mit SYBR Green als Fluoreszenzfarbstoff einsetzten, um *B. cereus* Sporen in Lebensmittelproben zu quantifizieren und dabei bis zu 6×10^1 KbE/ml erfolgreich nachweisen konnten. Die real-time PCR, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, basierte ebenfalls auf SYBR Green, zum Nachweis wurde ein von WEHRLE et al. (2010) beschriebenes Primerpaar für das *nheA*-Gen von *B. cereus* eingesetzt. Dieses Gen konnte von NGAMWONGSATIT et al. (2008) in 100 % aller untersuchten *B. cereus* Stämme ($n = 411$) gefunden werden, kommt aber auch in anderen Vertretern der Cereus-Gruppe (hauptsächlich *B. thuringiensis*) vor, nicht jedoch in anderen Bazillen (EHLING-SCHULZ et al., 2006; WEHRLE et al., 2009). Damit besitzt die PCR für dieses Gen eine hohe Selektivität für potentiell pathogene Bazillen. Nach Optimierung des PCR-Verfahrens wurde eine quantitative Nachweisgrenze von $2,5 \times 10^3$ KbE pro Probe erreicht, der Aufschluss war kompatibel mit dem Elutionspuffer der Bioaffinitätschromatographiesäulen. Somit lag die Nachweisgrenze für Sporen in diesem System noch unter derjenigen des luminometrischen Sandwich-EIAs, und gleichzeitig wurde die Selektivität für *B. cereus* und die Cereus-Gruppe gesteigert.

Mit den polyklonalen Kaninchenseren gegen *S. aureus*, für deren Herstellung ganze, inaktivierte Keime als Immunogen eingesetzt wurden, konnte eine Nachweisgrenze von $9,1 \times 10^3$ KbE/ml in einem optimierten Sandwich-EIA (3.3.5.3.1.2) erreicht werden. Mit dem Kombinations-Sandwich-EIA (3.3.5.3.1.3) bei dem der Protein-A spezifische mAk 1E9 als Fangantikörper und peroxidase markierte Kaninchenseren als Nachweisantikörper eingesetzt wurden konnten bis zu 2×10^4 KbE/ml nachgewiesen werden. Der für *S. aureus* spezifische mAk 2C2 zeigte hingegen eine geringere Affinität, die Nachweisgrenzen lagen im Bereich von 10^6 KbE/ml.

4.3 Bioaffinitätsanreicherung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine auf einem Monolithen basierende Bioaffinitätsanreicherung von *B. cereus* Sporen aus Magermilch realisiert werden. Bei der Anreicherung der Sporen aus 100 ml Magermilch wurde ein durchschnittlicher Konzentrationsfaktor von 19,6 erreicht. Bei Berücksichtigung der Nachweisgrenzen des luminometrischen Sandwich-EIAs von $5,4 \times 10^3$ KbE/ml bzw. der real-time PCR von $2,5 \times 10^3$ KbE/ml können mit dem etablierten Verfahren somit $2,8 \times 10^2$ bzw. $1,3 \times 10^2$ Sporen von *B. cereus* pro ml Milch innerhalb von 5 bzw. 4 Stunden zuverlässig nachgewiesen werden. Vergleichbare Studien anderer Autoren liegen nicht vor. Proben, die noch weniger Material enthalten, würden in der real-time PCR immer noch ein positives Signal geben, aus dem allerdings nicht mehr auf den wahren Gehalt des Ausgangsmaterials geschlossen werden könnte. Damit liegen beide Verfahren unter dem Grenzwert der Europäischen Kommission, die einen Maximalgehalt von 5×10^2 KbE/g für getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter sechs Monaten bestimmt sind, festgelegt hat (VO (EG) NR. 1441/2007), andere Rechtsvorschriften zu *B. cereus* existieren derzeit nicht.

Die Versuche zur Anreicherung von *S. aureus* in der Bioaffinitätschromatographie scheiterten hingegen. Die Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass die verwendeten pAk gegen *S. aureus* während der Immobilisierung sowohl an der monolithischen Säulenmatrix, als auch am Sepharosegel ihre biologische Aktivität verlieren. Die Seren zeigten im EIA und in der Immunfluoreszenz eine deutliche Reaktion mit lebenden *S. aureus* Keimen, auch für Agglutinationsreaktionen konnten die Antikörper eingesetzt werden. Letzteres weist aber darauf hin, dass das Serum v.a. vernetzungsfähige Antikörper vom IgM-Subtyp enthält, die eine geringere Stabilität als Antikörper vom IgG-Subtyp aufweisen (KNUTSON et al., 1991; TORNOE et al., 1997). Ein Vorherrschen von spezifischen IgM-Antikörpern in den Seren würde erklären, warum diese, so lange sie frei sind, mit den Keimen reagieren, aber nach Immobilisierung an einer Säulenmatrix infolge Aktivitätsverlust keine Bakterien mehr binden können.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Antikörper gegen vegetative Formen von *B. cereus*, Sporen von *B. cereus* und *S. aureus* sind geeignet, in spezifischen, sensitiven Nachweisverfahren für diese Bakterien eingesetzt zu werden. Für Sporen von *B. cereus* wurde ein solches Verfahren mittels Bioaffinitätsanreicherung und anschließender real-time PCR für Magermilchproben bereits realisiert. Die komplette Analyse der Proben ist dabei in unter vier

Stunden möglich, bisherige Methoden benötigten immer mindestens einen Inkubationsschritt über Nacht, um die Konzentrationen der Bazillen weit genug anzuheben (2.1.4 und 2.2.4). Die Nachweisgrenzen der hier vorgestellten Methode liegen unterhalb der existierenden gesetzlichen Grenzwerte für *B. cereus*, wodurch der Einsatz in der Routinediagnostik möglich und sinnvoll erscheint. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass die Anwendung von Bioaffinitätschromatographie in der mikrobiologischen Untersuchung von Lebensmitteln großes Potential besitzt, Abläufe zu beschleunigen und Kosten zu sparen. Gerade mit dem mAk 2C2 gegen *S. aureus* könnte es gelingen, ein effizientes und hoch spezifisches Nachweisverfahren für diese in der Lebensmittelhygiene als Prozesshygienekriterium verwendete Spezies zu entwickeln und zu etablieren. Das Spektrum der möglichen Anwendungen umfasst aber nicht nur Lebensmittelproben, sondern auch Umweltproben und, gerade im Fall von pathogenen Keimen, die medizinische Diagnostik.

5 Zusammenfassung

Bacillus (B.) cereus und *Staphylococcus (S.) aureus* sind pathogene Bakterien, die schwere Erkrankungen sowohl gastrointestinaler, als auch extragastrointestinaler oder sogar systemischer Natur auslösen können. Koagulasepositive Staphylokokken sind in VO (EG) Nr. 2073/2005 als Prozesshygienekriterium festgelegt, ebenso präsumtive *B. cereus* in der VO (EG) Nr. 1441/2007. In der vorliegenden Arbeit sollte basierend auf einer Bioaffinitätsanreicherung ein schneller Nachweis beider Keime aus Magermilch unter Vermeidung einer zeitaufwändigen Anreicherung etabliert werden.

Zur Gewinnung der dafür benötigten Antikörper wurden verschiedene Keimpräparationen unter optimierten Anzucht- und Inaktivierungsverfahren hergestellt, die sowohl für die Immunisierung, als auch als Antigen für die Enzymimmuntests eingesetzt wurden. Die beiden gegen *S. aureus* und Sporen von *B. cereus* hergestellten Kaninchenantisera ermöglichten in einem Sandwich-EIA den Nachweis von $9,1 \times 10^3$ KbE/ml bzw. $5,4 \times 10^3$ KbE/ml. Beide Sera zeigten aber Kreuzreaktionen mit anderen Vertretern des jeweiligen Genus. Ein zum Nachweis von *B. cereus* Sporen gewonnener mAk war hingegen hoch selektiv, die Affinität (im Bereich von 10^6 - 10^8 KbE/ml) ermöglichte aber nicht den sensitiven Nachweis dieser Keime. Drei mAk gegen vegetative Formen von *B. cereus* zeichneten sich durch eine hohe Affinität (4×10^4 - 9×10^4 KbE/ml) und eine breite Reaktivität mit Vertretern der *Cereus*-Gruppe, insbesondere mit *B. cereus* selbst, aus. Drei weitere, weniger affine mAk zeigten hingegen eine hohe Spezifität für einzelne Vertreter der Spezies *B. cereus* bzw. der *Cereus*-Gruppe. Alle sechs mAk zeigten im Immunoblot Reaktionen mit Oberflächenproteinpräparationen von *B. cereus*. Der gegen Protein-A von *S. aureus* gerichtete mAk 1E9 erreichte in einem indirekten EIA mit inaktiviertem Antigen eine Nachweisgrenze von < 2 ng/ml und reagierte mit 74 von 87 getesteten *S. aureus* Stämmen. In den Untersuchungen mit 111 Staphylokokkenstämmen erkannte mAk 2C2 gegen *S. aureus* alle 87 *S. aureus* Stämme, ohne Kreuzreaktionen mit anderen Staphylokokken, allerdings mit leicht geringerer Affinität als mAk 1E9.

Nach Beschichtung von Monolithen mit spezifischen Kaninchenantisera konnte für Sporen von *B. cereus* eine Konzentrierung der Keime direkt aus Magermilchproben realisiert werden (durchschnittlicher Anreicherungsfaktor 19,6). In Kombination mit einem real-time PCR Verfahren gelang es, Sporengehalte von 10^2 KbE/ml Magermilch innerhalb von vier Stunden nachzuweisen. Dies stellt eine deutliche Verbesserung gegenüber den herkömmlichen Verfahren dar.

5 Summary

Production of poly- and monoclonal antibodies against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and spores of *Bacillus cereus* for the development of a quick bioaffinity chromatographic detection system

Bacillus (B.) cereus and *Staphylococcus (S.) aureus* are pathogenic bacteria able to induce severe gastrointestinal, extra-gastrointestinal or even systemic diseases. Coagulase-positive staphylococci are defined as process hygiene criteria in VO (EG) Nr. 2073/2005, as are presumptive *B. cereus* in VO (EG) Nr. 1441/2007. The aim of this work was to establish a quick detection system for both germs based on bioaffinity enrichment without the need for a time consuming growth step.

To this end, different bacterial preparations were produced in optimized methods of growth and inactivation, and employed in both immunisations and as antigens in the enzyme immunological assays. The two rabbit sera produced against *S. aureus* and spores of *B. cereus* enabled the detection of 9.1×10^3 CFU/ml and 5.4×10^3 CFU/ml in a sandwich EIA. Both sera showed cross reactivity with other members of the particular genus, though. Monoclonal antibody (mAb) 1F12 for the detection of spores of *B. cereus* was highly selective, but the affinity (in the range of 10^6 - 10^8 CFU/ml) did not enable sensitive detection of these germs. Three mAbs against vegetative cells of *B. cereus* showed high affinity (4×10^4 - 9×10^4 CFU/ml) and broad reactivity with members of the Cereus-group, especially *B. cereus* itself. Three further mAbs, with lower affinity, showed high specificity for some members of the species *B. cereus* and the Cereus-group. All six mAbs showed reactions with surface protein preparations of *B. cereus* in the immunoblot. MAb 1E9 against protein-A from *S. aureus* reached a limit of detection of < 2 ng/ml in an indirect EIA with inactivated antigen and reacted with 75 of 87 *S. aureus* strains tested. In the experiments with 111 strains of staphylococci, mAb 2C2 against *S. aureus* recognised all 87 strains of *S. aureus*, without cross reacting with other staphylococci, though with slightly less affinity than mAb 1E9.

After coating of monoliths with specific rabbit sera, spores of *B. cereus* were concentrated directly from skim milk samples (mean enrichment factor 19.6). In combination with a real-time PCR, spore concentrations of 10^2 CFU/ml in skim milk were successfully detected in four hours. This is a distinct improvement compared to the conventional methods.

6 Literaturverzeichnis

AGATA N, MORI M, OHTA M, SUWAN S, OHTANI I & ISOBE M (1994):

A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells.

FEMS Microbiol Lett 121: 31-34.

AHMED MU, HOSSAIN MM & TAMIYA E (2008):

Electrochemical biosensors for medical and food applications.

Electroanalysis 20: 616-626.

ALTIPARMAK UE, OZER PA, OZKUYUMCU C, US AD, ASLAN BS & DUMAN S (2007):

Postoperative endophthalmitis caused by *Bacillus cereus* and *Chlamydia trachomatis*.

J Cataract Refract Surg 33: 1284-1287.

ANDERSSON A, RONNER U & GRANUM PE (1995):

What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?

Int J Food Microbiol 28: 145-155.

ANKOLEKAR C, RAHMATI T & LABBE RG (2009):

Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in US rice.

Int J Food Microbiol 128: 460-466.

ARORA P, SINDHU A, DILBAGHI N & CHAUDHURY A (2011):

Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens.

Biosens Bioelectron 28: 1-12.

ATKINS KL, BURMAN JD, CHAMBERLAIN ES, COOPER JE, POUTREL B, BAGBY S, JENKINS AT, FEIL EJ & VAN DEN ELSEN JM (2008):

S. aureus IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation.

Mol Immunol 45: 1600-1611.

BAIRD-PARKER AC (1962):

Improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci.

J Appl Microbiol 25: 12-19.

BALABAN N & RASOOLY A (2000):

Staphylococcal enterotoxins.

Int J Food Microbiol 61: 1-10.

BARBER M & ROZWADOWSKA-DOWZENKO M (1948):

Infection by penicillin-resistant staphylococci.

Lancet 2: 641-644.

BARBER MA (1914):

Milk poisoning due to a type of *Staphylococcus albus* occurring in the udder of a healthy cow.

Philippine J. Sci., Sect. B. (Trop. Med.) 9: 515-519.

BECKER H, GANGSTILLER K & TERPLAN G (1989):

Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk with special reference to the clumping factor.

Neth Milk Dairy J 43: 355-366.

BECKER H, SCHALLER G, VON WIESE W & TERPLAN G (1994):

Bacillus cereus in infant foods and dried milk products.

Int J Food Microbiol 23: 1-15.

BECKER H, BÜRK C & MÄRTLBAUER E (2007):

Staphylococcus-enterotoxins: Formation, characteristics and detection.

J Verbrauch Lebensm 2: 171-189.

BECKER H & MÄRTLBAUER E (2011):

Koagulasepositive Staphylokokken.

In: Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Baumgart J, Becker B, Stephan R, eds. Hamburg: B. Behr's Verlag GmbH & Co. KG: III 2.2.1.

- BECKERS HJ, VANLEUSDEN FM, BINDSCHEDLER O & GUERRAZ D (1984):
Evaluation of a pour-plate system with a rabbit plasma bovine fibrinogen agar for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in food.
Can J Microbiol 30: 470-474.
- BERGDOLL MS (1989):
Staphylococcus aureus.
In: Foodborne bacterial pathogens. Doyle MP, ed. New York, Basel: Marcel Dekker, Inc.: 463-523.
- BOTTONE EJ (2010):
Bacillus cereus, a volatile human pathogen.
Clin Microbiol Rev 23: 382-398.
- BOUCHER HW & COREY GR (2008):
Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.
Clin Infect Dis 46 Suppl 5: 344-349.
- BREHM-STECHER B, YOUNG C, JAYKUS LA & TORTORELLO ML (2009):
Sample preparation: the forgotten beginning.
J Food Prot 72: 1774-1789.
- BREWSTER JD (2003):
Isolation and concentration of Salmonellae with an immunoaffinity column.
J Microbiol Methods 55: 287-293.
- BRÖKER BM & VAN BELKUM A (2011):
Immune proteomics of *Staphylococcus aureus*.
Proteomics 11: 3221-3231.
- BRUNO JG & CARRILLO MP (2012):
Development of aptamer beacons for rapid presumptive detection of *bacillus* spores.
J Fluoresc 22: 915-924.

BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND VERBRAUCHERSCHUTZ (2012):

Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Erfassung, Auswertung und Veröffentlichung von Daten über das Auftreten von Zoonosen und Zoonoseerregern entlang der Lebensmittelkette.

CALLEGAN MC, GUESS S, WHEATLEY NR, WOODS DC, GRIFFIN G, WISKUR BJ & LEONARD R (2011):

Efficacy of vitrectomy in improving the outcome of *Bacillus cereus* endophthalmitis. Retina 31: 1518-1524.

CAO X, LI S, CHEN L, DING H, XU H, HUANG Y, LI J, LIU N, CAO W, ZHU Y, SHEN B & SHAO N (2009):

Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res 37: 4621-4628.

CASTEDO E, CASTRO A, MARTIN P, RODA J & MONTERO CG (1999):

Bacillus cereus prosthetic valve endocarditis. Ann Thorac Surg 68: 2351-2352.

CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2005):

Outbreak of cutaneous *Bacillus cereus* infections among cadets in a university military program--Georgia, August 2004. Report, MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1233-1235.

CHANG YH, SHANGKUAN YH, LIN HC & LIU HW (2003):

PCR assay of the *groEL* gene for detection and differentiation of *Bacillus cereus* group cells. Appl Environ Microbiol 69: 4502-4510.

CHARNI N, PERISSOL C, LE PETIT J & RUGANI N (2000):

Production and characterization of monoclonal antibodies against vegetative cells of *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol 66: 2278-2281.

CHOPIN A, MALCOLM S, JARVIS G, ASPERGER H, BECKERS HJ, BERTONA AM, COMINAZZINI C, CARINI S, LODI R, HAHN G, HEESCHEN W, JANS JA, JERVIS DI, LANIER JM, OCONNOR F, REA M, ROSSI J, SELIGMANN R, TESONE S, WAES G, MOCQUOT G & PIVNICK H (1985):

ICMSF Methods Studies 15. Comparison of 4 media and methods for enumerating *Staphylococcus aureus* in powdered milk.

J Food Prot 48: 21-27.

CLIFF JB, JARMAN KH, VALENTINE NB, GOLLEDGE SL, GASPAR DJ, WUNSCHEL DS & WAHL KL (2005):

Differentiation of spores of *Bacillus subtilis* grown in different media by elemental characterization using time-of-flight secondary ion mass spectrometry.

Appl Environ Microbiol 71: 6524-6530.

COHN F (1872):

Untersuchungen über Bakterien.

Beiträge zur Biologie der Pflanzen Heft 2: 127-224.

Zitiert nach EUZÉBY (2012).

CONE LA, DREISBACH L, POTTS BE, COMESS BE & BURLEIGH WA (2005):

Fatal *Bacillus cereus* endocarditis masquerading as an anthrax-like infection in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report.

J Heart Valve Dis 14: 37-39.

CUCHACOVICH R, JAPA S, HUANG WQ, CALVO A, VEGA L, VARGAS RB, SINGH R, FLORES D, CASTRO I & ESPINOZA LR (2002):

Detection of bacterial DNA in Latin American patients with reactive arthritis by polymerase chain reaction and sequencing analysis.

J Rheumatol 29: 1426-1429.

DACK GM, CARY WE, WOOL-PERT O & WIGGERS H (1930):

An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow hemolytic *Staphylococcus*.

Jour Prevent Med 4: 167-175.

DAINIAK MB, PLIEVA FM, GALAEV IY, HATTI-KAUL R & MATTIASSON B (2005):
Cell chromatography: separation of different microbial cells using IMAC supermacroporous
monolithic columns.

Biotechnol Prog 21: 644-649.

DANCER SJ, MCNAIR D, FINN P & KOLSTO AB (2002):

Bacillus cereus cellulitis from contaminated heroin.

J Med Microbiol 51: 278-281.

DAUM RS & SPELLBERG B (2012):

Progress toward a *Staphylococcus aureus* vaccine.

Clin Infect Dis 54: 560-567.

DAUPHIN LA, MOSER BD & BOWEN MD (2009):

Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate
Bacillus anthracis spores and comparison of DNA yields from spores and spiked
environmental samples.

J Microbiol Methods 76: 30-37.

DE JONGHE V, COOREVITS A, DE BLOCK J, VAN COILLIE E, GRIJSPEERDT K,
HERMAN L, DE VOS P & HEYNDRICKX M (2010):

Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk.

Int J Food Microbiol 136: 318-325.

DE LA FUENTE R, SUAREZ G & SCHLEIFER KH (1985):

Staphylococcus aureus subsp. *anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of
sheep.

Int J Syst Bacteriol 35: 99-102.

DELEO FR, OTTO M, KREISWIRTH BN & CHAMBERS HF (2010):

Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

Lancet 375: 1557-1568.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (2010):

DIN 10198: Mikrobiologische Milchuntersuchung - Bestimmung präsumtiver *Bacillus cereus* - Koloniezählverfahren bei 37 °C.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (1999):

DIN 58967-30:1999-08: Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektions- und Immunkrankheiten - Teil 30: ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay); Begriffe, Allgemeine methodenspezifische Anforderungen.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (1999):

DIN EN ISO 6888: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für die Zählung von Koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und andere Spezies) - Teil 1: Verfahren mit Baird-Parker-Agar.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (1999):

DIN EN ISO 6888: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für die Zählung von Koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und andere Spezies) - Teil 2: Verfahren mit Kaninchenplasma-/Fibrinogen-Agar.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (2005):

DIN EN ISO 6888: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren für die Zählung von Koagulase-positiven Staphylokokken (*Staphylococcus aureus* und andere Spezies) - Teil 3: Nachweis und MPN-Verfahren für niedrige Keimzahlen.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (2005):

DIN EN ISO 7932: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zur Zählung von präsumtivem *Bacillus cereus* - Koloniezählverfahren bei 30 °C (ISO 7932:2004).

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG (2006):

DIN EN ISO 21871: Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln - Horizontales Verfahren zur Bestimmung niedriger Zahlen von präsumtivem *Bacillus cereus* - Verfahren der wahrscheinlichsten Keimzahl (MPN) und Nachweisverfahren (ISO 21871:2006).

DIETRICH R, USLEBER E & MÄRTLBAUER E (1998):

The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins.

Analyst 123: 2749-2754.

DOHMAE S, OKUBO T, HIGUCHI W, TAKANO T, ISOBE H, BARANOVICH T, KOBAYASHI S, UCHIYAMA M, TANABE Y, ITOH M & YAMAMOTO T (2008):

Bacillus cereus nosocomial infection from reused towels in Japan.

J Hosp Infect 69: 361-367.

DOMANSKI PJ, PATEL PR, BAYER AS, ZHANG L, HALL AE, SYRIBEYS PJ, GOROVITS EL, BRYANT D, VERNACHIO JH, HUTCHINS JT & PATTI JM (2005):

Characterization of a humanized monoclonal antibody recognizing clumping factor A expressed by *Staphylococcus aureus*.

Infect Immun 73: 5229-5232.

DREISBACH A, VAN DIJL JM & BUIST G (2011):

The cell surface proteome of *Staphylococcus aureus*.

Proteomics 11: 3154-3168.

DROBNIEWSKI FA (1993):

Bacillus cereus and related species.

Clin Microbiol Rev 6: 324-338.

EHLING-SCHULZ M, FRICKER M & SCHERER S (2004):

Bacillus cereus, the causative agent of an emetic type of food-borne illness.

Mol Nutr Food Res 48: 479-487.

EHLING-SCHULZ M, GUINEBRETIERE MH, MONTHÁN A, BERGE O, FRICKER M & SVENSSON B (2006):

Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*.

FEMS Microbiol Lett 260: 232-240.

ESTEBAN-FERNÁNDEZ DE ÁVILA B, PEDRERO M, CAMPUZANO S, ESCAMILLA-GÓMEZ V & PINGARRÓN JM (2012):

Sensitive and rapid amperometric magnetoimmunosensor for the determination of *Staphylococcus aureus*.

Anal Bioanal Chem 403: 917-925.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA, 2012):

The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010.

Euro Surveill 17: 21-21.

EUZÉBY JP (2012):

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.

<http://www.bacterio.cict.fr/>

EZZELL JW, JR. & ABSHIRE TG (1988):

Immunological analysis of cell-associated antigens of *Bacillus anthracis*.

Infect Immun 56: 349-356.

FAYE C, CHAMIEH J, MOREAU T, GRANIER F, FAURE K, DUGAS V, DEMESMAY C & VANDENABEELE-TRAMBOUZE O (2012):

In situ characterization of antibody grafting on porous monolithic supports.

Anal Biochem 420: 147-154.

FLEMING A (1980):

Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the British Journal of Experimental Pathology 10:226-236, 1929.

Rev Infect Dis 2: 129-139.

FLUIT AC (2012):

Livestock-associated *Staphylococcus aureus*.

Clin Microbiol Infect 18: 735-744.

FORSBERG LS, CHOUDHURY B, LEOFF C, MARSTON CK, HOFFMASTER AR, SAILE E, QUINN CP, KANNENBERG EL & CARLSON RW (2011):

Secondary cell wall polysaccharides from *Bacillus cereus* strains G9241, 03BB87 and 03BB102 causing fatal pneumonia share similar glycosyl structures with the polysaccharides from *Bacillus anthracis*.

Glycobiology 21: 934-948.

FRANKLAND GC & FRANKLAND PF (1887):

Studies on Some New Micro-Organisms Obtained from Air.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci Vol. 178: pp. 257-287.

GIBSON T & GORDON RE (1974):

Bacillus.

In: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edn. Buchanan RE, Gibbons NE, eds. Baltimore: Williams & Wilkins: 529-550.

GÓMEZ DE LA TORRE TZ, KE R, MEZGER A, SVEDLINDH P, STRØMME M & NILSSON M (2012):

Sensitive Detection of Spores Using Volume-Amplified Magnetic Nanobeads.

Small: 10.1002/sml.201102632.

GORWITZ RJ, KRUSZON-MORAN D, MCALLISTER SK, MCQUILLAN G, MCDOUGAL LK, FOSHEIM GE, JENSEN BJ, KILLGORE G, TENOVER FC & KUEHNERT MJ (2008):

Changes in the prevalence of nasal colonization with *Staphylococcus aureus* in the United States, 2001-2004.

J Infect Dis 197: 1226-1234.

GRANUM PE (2007):

Bacillus cereus.

In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 3rd edn. Doyle MP, Beuchat LR, eds. Washington, D.C.: ASM Press: 445-455.

GROSCHER D, BURGESS MA & BODEY GP, SR. (1976):

Gas gangrene-like infection with *Bacillus cereus* in a lymphoma patient.

Cancer 37: 988-991.

GUIDRY A, FATTOM A, PATEL A, O'BRIEN C, SHEPHERD S & LOHUIS J (1998):

Serotyping scheme for *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis.

Am J Vet Res 59: 1537-1539.

GULLEDGE JS, LUNA VA, LUNA AJ, ZARTMAN R & CANNONS AC (2010):

Detection of low numbers of *Bacillus anthracis* spores in three soils using five commercial DNA extraction methods with and without an enrichment step.

J Appl Microbiol 109: 1509-1520.

GUO XW (2012):

Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review.

J Biophotonics 5: 483-501.

HAGE DS (1999):

Affinity chromatography: A review of clinical applications.

Clin Chem 45: 593-615.

HAGE DS, ANGUIZOLA JA, BI C, LI R, MATSUDA R, PAPASTAVROS E, PFAUNMILLER E, VARGAS J & ZHENG X (2012):

Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments.

J Pharm Biomed Anal 69: 93-105.

HALL AE, DOMANSKI PJ, PATEL PR, VERNACHIO JH, SYRIBEYS PJ, GOROVITS EL, JOHNSON MA, ROSS JM, HUTCHINS JT & PATTI JM (2003):

Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing *Staphylococcus aureus* MSCRAMM protein clumping factor A.

Infect Immun 71: 6864-6870.

HARTUNG M & KÄSBOHRER A (2011):

Erreger von Zoonosen in Deutschland im Jahr 2009.

Bundesamt für Risikobewertung BfR-Wissenschaft: 01/2011.

HAUGE S (1950):

B. cereus as a cause of food poisoning.

Nordisk Hyg Tidskr 31: 189-206.

HAUGE S (1955):

Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli.

J Appl Microbiol Volume 18: 591-595.

HENNEKINNE JA, DE BUYSER ML & DRAGACCI S (2012):

Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation.

FEMS Microbiol Rev 36: 815-836.

HENRICKSON KJ, SHENEP JL, FLYNN PM & PUI CH (1989):

Primary cutaneous *Bacillus cereus* infection in neutropenic children.

Lancet 1: 601-603.

HIRABAYASHI K, SHIOHARA M, SUZUKI T, SAITO S, TANAKA M, YANAGISAWA R, TSURUTA G, FUKUYAMA T, HIDAKA Y, NAKAZAWA Y, SHIMIZU T, SAKASHITA K & KOIKE K (2012):

Critical illness polyneuropathy and myopathy caused by *Bacillus cereus* sepsis in acute lymphoblastic leukemia.

J Pediatr Hematol Oncol 34: e110-113.

HOFFMASTER AR, HILL KK, GEE JE, MARSTON CK, DE BK, POPOVIC T, SUE D, WILKINS PP, AVASHIA SB, DRUMGOOLE R, HELMA CH, TICKNOR LO, OKINAKA RT & JACKSON PJ (2006):

Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes.

J Clin Microbiol 44: 3352-3360.

HOILE R, YUEN M, JAMES G & GILBERT GL (2007):

Evaluation of the rapid analyte measurement platform (RAMP) for the detection of *Bacillus anthracis* at a crime scene.

Forensic Sci Int 171: 1-4.

HOLBROOK R & ANDERSON JM (1980):

An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods.

Can J Microbiol 26: 753-759.

HONG HA, DUC LE H & CUTTING SM (2005):

The use of bacterial spore formers as probiotics.

FEMS Microbiol Rev 29: 813-835.

ICHIKAWA K, GAKUMAZAWA M, INABA A, SHIGA K, TAKESHITA S, MORI M & KIKUCHI N (2010):

Acute encephalopathy of *Bacillus cereus* mimicking Reye syndrome.

Brain Dev 32: 688-690.

IVANOVA N, SOROKIN A, ANDERSON I, GALLERON N, CANDELON B, KAPATRAL V, BHATTACHARYYA A, REZNIK G, MIKHAILOVA N, LAPIDUS A, CHU L, MAZUR M, GOLTSMAN E, LARSEN N, D'SOUZA M, WALUNAS T, GRECHKIN Y, PUSCH G, HASELKORN R, FONSTEIN M, EHRLICH SD, OVERBEEK R & KYRPIDES N (2003):

Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*.

Nature 423: 87-91.

JAIN N, MERWYN S, RAI GP & AGARWAL GS (2012):

Real-time polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of anthrax spores in spiked soil and talcum powder.

Folia Microbiol (Praha) 57: 237-242.

JEVONS MP, ROLINSON GN & KNOX R (1961):

Celbenin-resistant staphylococci.

Br Med J 1: 124-125.

JOHN JF, JR. (2006):

Drug evaluation: tefibazumab--a monoclonal antibody against staphylococcal infection.

Curr Opin Mol Ther 8: 455-460.

KATSUYA H, TAKATA T, ISHIKAWA T, SASAKI H, ISHITSUKA K, TAKAMATSU Y & TAMURA K (2009):

A patient with acute myeloid leukemia who developed fatal pneumonia caused by carbapenem-resistant *Bacillus cereus*.

J Infect Chemother 15: 39-41.

KELLY-QUINTOS C, CAVACINI LA, POSNER MR, GOLDMANN D & PIER GB (2006):

Characterization of the opsonic and protective activity against *Staphylococcus aureus* of fully human monoclonal antibodies specific for the bacterial surface polysaccharide poly-*N*-acetylglucosamine.

Infect Immun 74: 2742-2750.

KIM HK, EMOLO C, DEDENT AC, FALUGI F, MISSIAKAS DM & SCHNEEWIND O (2012):

Protein A-specific monoclonal antibodies and the prevention of *Staphylococcus aureus* disease in mice.

Infect Immun: 10.1128/IAI.00230-00212.

KING D, LUNA V, CANNONS A, CATTANI J & AMUSO P (2003):

Performance assessment of three commercial assays for direct detection of *Bacillus anthracis* spores.

J Clin Microbiol 41: 3454-3455.

KIRBY WM (1944):

Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant Staphylococci.

Science 99: 452-453.

KLOTH K, RYE-JOHNSEN M, DIDIER A, DIETRICH R, MÄRTLBAUER E, NIESSNER R & SEIDEL M (2009):

A regenerable immunochip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk.

Analyst 134: 1433-1439.

KNUTSON VP, BUCK RA & MORENO RM (1991):

Purification of a murine monoclonal antibody of the IgM class.

J Immunol Methods 136: 151-157.

KÖCK R, BECKER K, COOKSON B, VAN GEMERT-PIJNEN JE, HARBARTH S, KLUYTMANS J, MIELKE M, PETERS G, SKOV RL, STRUELENS MJ, TACCONELLI E, NAVARRO TORNE A, WITTE W & FRIEDRICH AW (2010):

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe.

Euro Surveill 15: 19688.

KÖCK R, MELLMANN A, SCHAUMBURG F, FRIEDRICH AW, KIPP F & BECKER K (2011):

The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany.

Dtsch Arztebl Int 108: 761-767.

KÖHLER G & MILSTEIN C (1975):

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature 256: 495-497.

KOLSTO AB, TOURASSE NJ & OKSTAD OA (2009):

What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species?

Annu Rev Microbiol 63: 451-476.

KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN (2007):

Verordnung (EG) Nr. 1441/2007 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN (2005):

Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel.

KRAMBERGER P, HONOUR RC, HERMAN RE, SMREKAR F & PETERKA M (2010):
Purification of the *Staphylococcus aureus* bacteriophages VDX-10 on methacrylate monoliths.

J Virol Methods 166: 60-64.

KRONVALL G, DOSSETT JH, QUIE PG & WILLIAMS RC (1971):

Occurrence of protein a in staphylococcal strains: quantitative aspects and correlation to antigenic and bacteriophage types.

Infect Immun 3: 10-15.

KUEHN A, KOVÁČ P, SAKSENA R, BANNERT N, KLEE SR, RANISCH H & GRUNOW R (2009):

Development of antibodies against anthrose tetrasaccharide for specific detection of *Bacillus anthracis* spores.

Clin Vaccine Immunol 16: 1728-1737.

KUROKI R, KAWAKAMI K, QIN L, KAJI C, WATANABE K, KIMURA Y, ISHIGURO C, TANIMURA S, TSUCHIYA Y, HAMAGUCHI I, SAKAKURA M, SAKABE S, TSUJI K, INOUE M & WATANABE H (2009):

Nosocomial bacteremia caused by biofilm-forming *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*.
Intern Med 48: 791-796.

LEDE I, VLAAR A, ROOSENDAAL R, GEERLINGS S & SPANJAARD L (2011):

Fatal outcome of *Bacillus cereus* septicemia.

Neth J Med 69: 514-516.

LEE H, YOON TJ & WEISSLEDER R (2009):

Ultrasensitive detection of bacteria using core-shell nanoparticles and an NMR-filter system.
Angew Chem Int Ed Engl 48: 5657-5660.

LEQUIN MH, VERMEULEN JR, VAN ELBURG RM, BARKHOF F, KORNELISSE RF, SWARTE R & GOVAERT PP (2005):

Bacillus cereus meningoencephalitis in preterm infants: neuroimaging characteristics.

AJNR Am J Neuroradiol 26: 2137-2143.

- LIN M, TODORIC D, MALLORY M, LUO BS, TROTTIER E & DAN H (2006):
Monoclonal antibodies binding to the cell surface of *Listeria monocytogenes* serotype 4b.
J Med Microbiol 55: 291-299.
- LINA G, BOHACH GA, NAIR SP, HIRAMATSU K, JOUVIN-MARCHE E & MARIUZZA R (2004):
Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*.
J Infect Dis 189: 2334-2336.
- LINDMARK R, THOREN-TOLLING K & SJOQUIST J (1983):
Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera.
J Immunol Methods 62: 1-13.
- LOEB L (1903):
The Influence of certain Bacteria on the Coagulation of the Blood.
J Med Res 10: 407-419.
- LOGAN NA (2012):
Bacillus and relatives in foodborne illness.
J Appl Microbiol 112: 417-429.
- LÓPEZ AC & ALIPPI AM (2007):
Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey.
Int J Food Microbiol 117: 175-184.
- LUBENAU (1906):
Bacillus peptonificans als Erreger einer Gastroenteritis-Epidemie.
Zbl Bakt I Abt Orig 40: 433-437.
- MAIRAL T, ÖZALP VC, LOZANO SÁNCHEZ P, MIR M, KATAKIS I & O'SULLIVAN CK (2008):
Aptamers: molecular tools for analytical applications.
Anal Bioanal Chem 390: 989-1007.

MARRACK P & KAPPLER J (1990):

The staphylococcal enterotoxins and their relatives.

Science 248: 705-711.

MARTINEZ-BLANCH JF, SANCHEZ G, GARAY E & AZNAR R (2009):

Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples.

Int J Food Microbiol 135: 15-21.

MCGRATH TF, ELLIOTT CT & FODEY TL (2012):

Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food.

Anal Bioanal Chem 403: 75-92.

MCLAUCHLIN J, MITHANI V, BOLTON FJ, NICHOLS GL, BELLIS MA, SYED Q, THOMSON RP & ASHTON JR (2002):

An investigation into the microflora of heroin.

J Med Microbiol 51: 1001-1008.

MELCONIAN AK, BRUN Y & FLEURETTE J (1983):

Enterotoxin production, phage typing and serotyping of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical materials and food.

J Hyg (Lond) 91: 235-242.

MIKAMI T, HIRAOKA K, MURAKAMI T, BOONLONG J, MATSUMOTO T & SUZUKI M (1990):

Detection of common flagella antigen in *Bacillus cereus* by monoclonal antibody.

Microbiol Immunol 34: 709-714.

MONNERAT RG, BATISTA AC, DE MEDEIROS PT, MARTINS ES, MELATTI VM, PRACA LB, DUMAS VF, MORINAGA C, DEMO C, GOMES ACM, FALCAO R, SIQUEIRA CB, SILVA-WERNECK JO & BERRY C (2007):

Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*.

Biol Control 41: 291-295.

MOSER AC & HAGE DS (2010):

Immunoaffinity chromatography: an introduction to applications and recent developments.

Bioanalysis 2: 769-790.

MOSSEL DA, KOOPMAN MJ & JONGERIUS E (1967):

Enumeration of *Bacillus cereus* in foods.

Appl Microbiol 15: 650-653.

MUCH H (1908):

A preliminary stage of the fibrin enzymes in cultures of *Staphylococcus aureus*.

Biochem Z 14: 143-155.

MURAKAMI T, HIRAOKA K, MIKAMI T, MATSUMOTO T, KATAGIRI S & SUZUKI M (1991):

Detection of *Bacillus cereus* flagellar antigen by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA).

Microbiol Immunol 35: 223-234.

NARSAIAH K, JHA SN, BHARDWAJ R, SHARMA R & KUMAR R (2012):

Optical biosensors for food quality and safety assurance-a review.

J Food Sci Technol-Mysore 49: 383-406.

NGAMWONGSATIT P, BUASRI W, PIANARIYANON P, PULSRIKARN C, OHBA M, ASSAVANIG A & PANBANGRED W (2008):

Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers.

Int J Food Microbiol 121: 352-356.

NICHOLSON WL, MUNAKATA N, HORNECK G, MELOSH HJ & SETLOW P (2000):

Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments.

Microbiol Mol Biol Rev 64: 548-572.

NIKODEMUSZ I, BOJAN M, KISS P, MOLNAR E, BODNAR S, LACZKO M, PAPAY D & KISS M (1962):

Aerobic Sporeforming Bacilli As Food Poisoners - Survey Of Corresponding Cases Of Food Poisoning Diagnosed In Hungary.

Zentralbl Bakteriол A 184: 462-470.

NIKODEMUSZ I (1965):

Die Reproduzierbarkeit der von *Bacillus cereus* verursachten Lebensmittelvergiftungen bei Katzen.

Zentralbl Bakteriол A 196: 81-87.

NIKODEMUSZ I & GONDA G (1966):

Die Wirkung langfristiger Verabreichung von *B. cereus* verunreinigten Lebensmitteln bei Katzen.

Zentralbl Bakteriол A 199: 64-67.

NIKODEMUSZ I (1967):

Enteropathogenic activity of *Bacillus cereus* in dogs.

Zentralbl Bakteriол A 202: 533-538.

NYGREN B (1962):

Phospholipase C-producing bacteria and food poisoning.

Acta Pathol Et Microbiol Scand Suppl 160: 1-89.

OGSTON A & WITTE W (1984):

On Abscesses.

Rev Infect Dis 6: 122-128.

OTT S, NIESSNER R & SEIDEL M (2011):

Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the fast and efficient immunofiltration of *Staphylococcus aureus*.

J Sep Sci 34: 1-12.

PALCHETTI I & MASCINI M (2008):

Electroanalytical biosensors and their potential for food pathogen and toxin detection.

Anal Bioanal Chem 391: 455-471.

PANTOSTI A (2012):

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Associated with Animals and Its Relevance to Human Health.

Front Microbiol 3: 127.

PAPPERT G, RIEGER M, NIESSNER R & SEIDEL M (2010):

Immunomagnetic nanoparticle-based sandwich chemiluminescence-ELISA for the enrichment and quantification of *E. coli*.

Microchim Acta 168: 1-8.

PARKINSON TJ, MERRALL M & FENWICK SG (1999):

A case of bovine mastitis caused by *Bacillus cereus*.

N Z Vet J 47: 151-152.

PATTI JM (2004):

A humanized monoclonal antibody targeting *Staphylococcus aureus*.

Vaccine 22 Suppl 1: 39-43.

PESKOLLER C, NIESSNER R & SEIDEL M (2009):

Development of an epoxy-based monolith used for the affinity capturing of *Escherichia coli* bacteria.

J Chromatogr A 1216: 3794-3801.

PILLAI A, THOMAS S & ARORA J (2006):

Bacillus cereus: the forgotten pathogen.

Surg Infect (Larchmt) 7: 305-308.

PIRTTIJÄRVI TS, ANDERSSON MA & SALKINOJA-SALONEN MS (2000):

Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes.

Int J Food Microbiol 60: 231-239.

PODGORNIK A, BARUT M, STRANCAR A, JOSIC D & KOLOINI T (2000):

Construction of large volume monolithic columns.

Anal Chem 72: 5693-5699.

QUINLAN JJ & FOEGEDING PM (1997):

Monoclonal antibodies for use in detection of *Bacillus* and *Clostridium* spores.

Appl Environ Microbiol 63: 482-487.

RAHMATI T & LABBE R (2008):

Levels and toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from retail seafood.

J Food Prot 71: 1178-1185.

RANGANATHA HG, ZAKI S & KESHAVAMURTHY BS (1981):

Bacillus cereus as a cause of abortion in a mare.

Curr Sci 50: 458-458.

RANIERI ML, IVY RA, MITCHELL WR, CALL E, MASIELLO SN, WIEDMANN M & BOOR KJ (2012):

Real-Time PCR Detection of *Paenibacillus* spp. in Raw Milk to Predict Shelf-Life Performance of Pasteurized Fluid Milk Products.

Appl Environ Microbiol: 10.1128/AEM.01361-01312.

ROBINSON SC (1979):

Bacillus cereus septic arthritis following arthrography.

Clin Orthop Relat Res: 237-238.

ROSE HL, DEWEY CA, ELY MS, WILLOUGHBY SL, PARSONS TM, COX V, SPENCER PM & WELLER SA (2011):

Comparison of eight methods for the extraction of *Bacillus atrophaeus* spore DNA from eleven common interferents and a common swab.

PLoS One 6: 10.1371/journal.pone.0022668.

ROSENBACH FJ (1884):

Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen

Bergmann, J.F., Wiesbaden. 1-122

SADA A, MISAGO N, OKAWA T, NARISAWA Y, IDE S, NAGATA M & MITSUMIZO S (2009):

Necrotizing fasciitis and myonecrosis "synergistic necrotizing cellulitis" caused by *Bacillus cereus*.

J Dermatol 36: 423-426.

SANCHEZ B, ARIAS S, CHAIGNEPAIN S, DENAYROLLES M, SCHMITTER JM, BRESSOLLIER P & URDACI MC (2009):

Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin.

Microbiology 155: 1708-1716.

SANDHU S, SCHOUTEN JA, THOMPSON J, DAVIS M & BUGG TD (2012):

Detection of *Staphylococcus aureus* cell walls by enzyme-linked immunoassay using antibodies prepared from a semi-synthetic peptidoglycan precursor.

Analyst 137: 1130-1136.

SATO K, ICHIYAMA S, OHMURA M, TAKASHI M, AGATA N, OHTA M & NAKASHIMA N (1998):

A case of urinary tract infection caused by *Bacillus cereus*.

J Infect 36: 247-248.

SCALLAN E, HOEKSTRA RM, ANGULO FJ, TAUXE RV, WIDDOWSON MA, ROY SL, JONES JL & GRIFFIN PM (2011):

Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens.

Emerg Infect Dis 17: 7-15.

SCHELIN J, WALLIN-CARLQUIST N, COHN MT, LINDQVIST R, BARKER GC & RADSTROM P (2011):

The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment.

Virulence 2: 580-592.

SCHIEFER B, MACDONALD KR, KLAVANO GG & VAN DREUMEL AA (1976):

Pathology of *Bacillus cereus* mastitis in dairy cows.

Can Vet J 17: 239-243.

SCHLEIFER K-H & BELL J (2009):

Staphylococcaceae.

In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn. De Vos P, Garritty G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainy F, Schleifer K-H, Whitman WB, eds. New York: Springer Verlag: 392-421.

SCHRICKER ME, THOMPSON GH & SCHREIBER JR (1994):

Osteomyelitis due to *Bacillus cereus* in an adolescent: case report and review.

Clin Infect Dis 18: 863-867.

SCHUH J & WEINSTOCK D (1985):

Bovine abortion caused by *Bacillus cereus*.

J Am Vet Med Assoc 187: 1047-1048.

SENESI S & GHELARDI E (2010):

Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins.

Toxins (Basel) 2: 1690-1703.

SJÖHOLM I, BJERKÉN A & SJÖQUIST J (1973):

Protein A from *Staphylococcus aureus*. XIV. The effect of nitration of protein A with tetranitromethane and subsequent reduction.

J Immunol 110: 1562-1569.

SKEES JR, BOTTS A & ZEULI KA (2001):

The potential for recall insurance to improve food safety.

Int. Food Agribusiness Manage. Rev. 4: 99-111.

SKINNER D & KEEFER CS (1941):

Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus* - A study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals.

Arch Intern Med 68: 851-875.

SMITH NR, GORDON RE & CLARK FE (1952):

Aerobic spore-forming bacteria.

U S Dept Agric Monogr 16: 1-133.

SOKOLOVSKY M, RIORDAN JF & VALLEE BL (1966):

Tetranitromethane. A reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins.

Biochemistry 5: 3582-3589.

SPIKA JS, VERBRUGH HA & VERHOEF J (1981):

Protein A effect on alternative pathway complement activation and opsonization of *Staphylococcus aureus*.

Infect Immun 34: 455-460.

STANZEL C (1994):

Beitrag zur serologischen Identifikation von *Bacillus*-Stämmen mit Hilfe der Co-Agglutination am Beispiel der Spezies *B. cereus*.

Dissertation. Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, Berlin.

STEEN MK, BRUNO-MURTHA LA, CHAUX G, LAZAR H, BERNARD S & SULIS C (1992):

Bacillus cereus endocarditis: report of a case and review.

Clin Infect Dis 14: 945-946.

STEFANI S, CHUNG DR, LINDSAY JA, FRIEDRICH AW, KEARNS AM, WESTH H & MACKENZIE FM (2012):

Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods.

Int J Antimicrob Agents 39: 273-282.

STENFORS ARNESEN LP, FAGERLUND A & GRANUM PE (2008):

From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins.

FEMS Microbiol Rev 32: 579-606.

STEVENS KA & JAYKUS LA (2004):

Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review.

Crit Rev Microbiol 30: 7-24.

STEWART GS, JOHNSTONE K, HAGELBERG E & ELLAR DJ (1981):

Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction.

Biochem J 198: 101-106.

SUBRAMANIAN A, IRUDAYARAJ J & RYAN T (2006):

Mono and dithiol surfaces on surface plasmon resonance biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*.

Sens Actuator B-Chem 114: 192-198.

SUTHERLAND R & ROLINSON GN (1964):

Characteristics of Methicillin-Resistant Staphylococci.

J Bacteriol 87: 887-899.

TALLENT SM, KOTEWICZ KM, STRAIN EA & BENNETT RW (2012):

Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group.

J AOAC Int 95: 446-451.

TAMBORRINI M, HOLZER M, SEEBERGER PH, SCHÜRCH N & PLUSCHKE G (2010):

Anthrax spore detection by a luminex assay based on monoclonal antibodies that recognize anthrose-containing oligosaccharides.

Clin Vaccine Immunol 17: 1446-1451.

TATINI SR (1976):

Thermal stability of enterotoxins in food.

J Food Prot 39: 432-438.

TETALA KK & VAN BEEK TA (2010):

Bioaffinity chromatography on monolithic supports.

J Sep Sci 33: 422-438.

THOMAS D, CHOU S, DAUWALDER O & LINA G (2007):

Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins.

Chem Immunol Allergy 93: 24-41.

TORNOE I, TITLESTAD IL, KEJLING K, ERB K, DITZEL HJ & JENSENIUS JC (1997):

Pilot scale purification of human monoclonal IgM (COU-1) for clinical trials.

J Immunol Methods 205: 11-17.

VELTHUIS AGJ, MEUWISSEN MPM & HUIRNE RBM (2009):

Distribution of Direct Recall Costs Along the Milk Chain.

Agribusiness 25: 466-479.

VELTHUIS AGJ, REIJ MW, BARITAKIS K, DANG M & VAN WAGENBERG CPA (2010):

Recall costs balanced against spoilage control in Dutch custard.

J Dairy Sci 93: 2779-2791.

VILAS-BÔAS GT, PERUCA AP & ARANTES OM (2007):

Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*.

Can J Microbiol 53: 673-687.

WAGSTAFFE SJ, HILL KE, WILLIAMS DW, RANDLE BJ, THOMAS DW, STEPHENS P & RILEY DJ (2012):

Bispecific Antibody-Mediated Detection of the *Staphylococcus aureus* Thermonuclease.

Anal Chem 84: 5876-5884.

WALPER SA, ANDERSON GP, BROZOZOG LEE PA, GLAVEN RH, LIU JL, BERNSTEIN RD, ZABETAKIS D, JOHNSON L, CZARNECKI JM & GOLDMAN ER (2012):

Rugged single domain antibody detection elements for *Bacillus anthracis* spores and vegetative cells.

PLoS One 7: e32801.

WANG DB, BI LJ, ZHANG ZP, CHEN YY, YANG RF, WEI HP, ZHOU YF & ZHANG XE (2009a):

Label-free detection of *B. anthracis* spores using a surface plasmon resonance biosensor.

Analyst 134: 738-742.

WANG DB, YANG R, ZHANG ZP, BI LJ, YOU XY, WEI HP, ZHOU YF, YU Z & ZHANG XE (2009b):

Detection of *B. anthracis* spores and vegetative cells with the same monoclonal antibodies.

PLoS One 4: e7810.

WEHRLE E, MORAVEK M, DIETRICH R, BÜRK C, DIDIER A & MÄRTLBAUER E (2009):

Comparison of multiplex PCR, enzyme immunoassay and cell culture methods for the detection of enterotoxinogenic *Bacillus cereus*.

J Microbiol Methods 78: 265-270.

WEHRLE E, DIDIER A, MORAVEK M, DIETRICH R & MÄRTLBAUER E (2010):

Detection of *Bacillus cereus* with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR Green I.

Mol Cell Probes 24: 124-130.

WERNERY U, ALI M & COOPER JE (1996):

Bacillus cereus abortion in a nine year old dromedary camel - A case report.

J Camel Pract Res 3: 153-153.

WERTHEIM HF, MELLES DC, VOS MC, VAN LEEUWEN W, VAN BELKUM A, VERBRUGH HA & NOUWEN JL (2005):

The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections.

Lancet Infect Dis 5: 751-762.

WIELINGA PR, DE HEER L, DE GROOT A, HAMIDJAJA RA, BRUGGEMAN G, JORDAN K & VAN ROTTERDAM BJ (2011):

Evaluation of DNA extraction methods for *Bacillus anthracis* spores spiked to food and feed matrices at biosafety level 3 conditions.

Int J Food Microbiol 150: 122-127.

WOLFERTSTETTER C (1999):

Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen die von *Escherichia coli* produzierten intrazellulären Enzyme beta-Glucuronidase, beta-Galactosidase und Glutamatdecarboxylase.

Dissertation. Veterinärwissenschaftliches Department, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

WOLTER A, NIESSNER R & SEIDEL M (2008):

Detection of *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella typhimurium*, and *Legionella pneumophila* in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system.

Anal Chem 80: 5854-5863.

YAMADA S, OHASHI E, AGATA N & VENKATESWARAN K (1999):

Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice.

Appl Environ Microbiol 65: 1483-1490.

ZANGERL P & BECKER H (2012):

Culture media used in the detection and enumeration of coagulase-positive staphylococci.

In: Handbook of culture media for food and water microbiology, 3rd edn. Corry JEL, Curtis GDW, Baird RM, eds.: 130-154.

Tabelle A1: Zusammensetzung der Stammbibliothek für vegetative Formen von *B. cereus*, sowie deren Reaktivität mit den generierten mAk im indirekten EIA

Stamm	Herkunft	mAk					
		2C10	1E4	2E3	2E12	3G2	1B3
<i>B. cereus</i> DSM 31	DSM	++	-	+++	-	+	+++
<i>B. cereus</i> DSM 4312	DSM	++++	++	+++	++	++	-
<i>B. cereus</i> DSM 4384	DSM	++	++	++	++	++	++
<i>B. cereus</i> MHI M1	Gewürze	+++	+	+++	-	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 10	Kindernahrung	+	-	++	-	-	++
<i>B. cereus</i> MHI 22	Kindernahrung	++++	++	++++	-	+	++
<i>B. cereus</i> MHI 36	Kindernahrung	++	-	+++	-	-	++
<i>B. cereus</i> MHI 45a	Kindernahrung	+++	-	+++	-	-	++
<i>B. cereus</i> MHI 45b	Kindernahrung	++	-	+++	-	-	++
<i>B. cereus</i> MHI 70	Kindernahrung	++++	+	++++	+	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 85	Kindernahrung	+++	++	++++	++	++	++
<i>B. cereus</i> MHI 100a	Kindernahrung	++++	++	-	+	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 100b	Kindernahrung	++++	++	-	++	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 107	Kindernahrung	++++	++	++++	++	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 118	Kindernahrung	++++	++	++++	++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 140	Kindernahrung	++	++	++++	++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 157	Kindernahrung	++	+	-	+	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 161	DSM	++	-	+++	-	-	++
<i>B. cereus</i> MHI 162	DSM	+++	-	++++	-	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 164	DSM	+++	+	++++	+	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 166	DSM	++	++	++++	++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 167	DSM	+++	-	+++	-	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 168	DSM	++++	++	++++	++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 169	DSM	+++	-	+++	-	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 179	Milchpulver	++	-	-	-	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 180	past. Milch	++++	-	+++	-	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 183	Milchpulver	++	-	-	-	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 185	Schlagsahne	+	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 186	Butter	++++	++	++++	+	-	++++
<i>B. cereus</i> MHI 187	Schlagsahne	++++	++	++++	++	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 188	Cream	+++	++	++++	++	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 189	UHT-Milchshake	+++	+	++++	+	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 194	H-Milch	++	++	-	++	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 200	H-Milch	+++	+	++++	+	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 238	H-Milch	++++	++	++++	++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 252	sonstige	-	-	++	-	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 261	DSM	+	-	++	-	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 263	ATCC	++	-	++	-	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 264	ATCC	+	-	+	-	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 273	DSM	++++	++	++++	++	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 274	DSM	+++	++	++++	++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1303	DSM	++++	++	++++	++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 1304	Molkenpulver	++++	++	++++	++	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 1305/2	Reisspeise	++++	+	++++	+	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1306	Sahne	++++	+	++++	+	-	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1307	Norwegen	++++	-	-	-	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1322	sonstige	+++	-	++++	-	-	++
<i>B. cereus</i> MHI 1329	sonstige	+++	+	+++	-	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1337	Nudeln	++	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1339	Surimi	+++	-	+++	-	-	++
<i>B. cereus</i> MHI 1347	Pudding	++	-	-	-	-	+++

Stamm	Herkunft	mAk					
		2C10	1E4	2E3	2E12	3G2	1B3
<i>B. cereus</i> MHI 1348	Milch	++++	-	++++	-	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1350	Kartoffelpüree	++++	-	-	-	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1353	Spätzle	++++	-	++++	-	-	++
<i>B. cereus</i> MHI 1378	Suppe	++++	-	++++	-	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1382	Milch	+++	+	+++	+	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1393	sonstige	+++	-	++++	-	-	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1402	sonstige	++	-	+++	-	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1411	sonstige	++	-	+++	-	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1423	Milch	++++	++	++++	++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 1429	Milch	++++	++	++++	++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1440	Milch	+++	+	++++	+	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1445	Milch	++++	++	++++	++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1462	ATCC	++++	++	++++	++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 1471	Nudeln	++++	++	++++	++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 1483	sonstige	++	+	-	++	-	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1504	DSM	++++	++	++++	+++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 1505	DSM	++++	++	+++	++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1506	DSM	+++	+	+++	+	-	++
<i>B. cereus</i> MHI 1507	DSM	++++	+++	++++	+++	+++	-
<i>B. cereus</i> MHI 1524	sonstige	-	+	++++	+	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1542	sonstige	++++	++	++++	++	+++	-
<i>B. cereus</i> MHI 1559	sonstige	++++	++	++++	++	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 1575	Reisspeise	++++	++	++++	+++	+++	+
<i>B. cereus</i> MHI 1578	sonstige	-	+	+++	+	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1607	Geschnetzeltes	++++	++	++++	++	+++	-
<i>B. cereus</i> MHI 1645	sonstige	+	+	++++	+	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1658	sonstige	-	-	+	-	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 1672	past. Milch	++++	++	++++	++	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 1690	sonstige	++++	++	++++	++	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 1703	Speiseeis	++++	++	++++	++	++	-
<i>B. cereus</i> MHI 1719	sonstige	+++	-	+++	-	-	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1727	sonstige	+++	++	++++	++	++	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1732	sonstige	++	-	-	-	-	++++

- = keine Reaktion bei Keimzahlen von ca. $1,0 \times 10^7$ KbE/ml
+ = Reaktion bei Keimzahlen zwischen ca. $3,3 \times 10^6$ und $1,0 \times 10^7$ KbE/ml
++ = Reaktion bei Keimzahlen zwischen ca. $1,0 \times 10^6$ und $3,3 \times 10^6$ KbE/ml
+++ = Reaktion bei Keimzahlen zwischen ca. $3,3 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^6$ KbE/ml
++++ = Reaktion bei Keimzahlen unter ca. $3,3 \times 10^5$ KbE/ml

Tabelle A2: Zusammensetzung der Stammbibliothek für vegetative Formen der Stämme der *Cereus*-Gruppe, sowie deren Reaktivität mit den generierten mAk im indirekten EIA. Die Einteilung der Reaktivität erfolgte nach den in Tab. A1 definierten Kriterien.

Stamm	Herkunft	mAk					
		2C10	1E4	2E3	2E12	3G2	1B3
<i>B. weihenstephanensis</i> MHI 170	past. Milch	++	-	-	-	-	+
<i>B. weihenstephanensis</i> MHI 176	Schlagsahne	+	-	-	-	-	+
<i>B. weihenstephanensis</i> MHI 178a	Schlagsahne	++	++	-	++	-	++++
<i>B. weihenstephanensis</i> MHI 178b	sonstige	++	++	-	++	+	++++
<i>B. mycoides</i> MHI 208	DSM	++	-	-	-	-	-
<i>B. mycoides</i> MHI 210	sonstige	++	-	-	-	-	-
<i>B. mycoides</i> MHI 1310	ATCC	++++	++	-	++	-	++++
<i>B. thuringiensis</i> MHI 257	DSM	+	+	++++	+	-	++++
<i>B. thuringiensis</i> MHI 271	sonstige	+	-	++++	-	-	++

Tabelle A3: Zusammensetzung der Stammbibliothek für vegetative Formen der Stämme der anderen Bazillen, sowie deren Reaktivität mit den generierten mAk im indirekten EIA. Die Einteilung der Reaktivität erfolgte nach den in Tab. A1 definierten Kriterien.

Stamm	Herkunft	mAk					
		2C10	1E4	2E3	2E12	3G2	1B3
<i>B. circulans</i> MHI 247	ATCC	-	-	-	-	-	-
<i>B. coagulans</i> MHI 248a	ATCC	-	-	-	-	-	-
<i>B. coagulans</i> MHI 248b	ATCC	-	-	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> MHI 209	DSM	-	-	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> MHI 251	sonstige	-	-	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> MHI 1629	Impfstoff	-	-	-	-	-	-
<i>B. polymyxa</i> MHI 258	ATCC	-	-	-	-	-	-
<i>B. sphaericus</i> MHI 253	ATCC	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> MHI 255	DSM	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> MHI 256	ATCC	-	-	-	-	-	-
<i>B. stearothermophilus</i> MHI 1449	DSM	+	-	-	-	-	-
<i>B. stearothermophilus</i> MHI 1455	DSM	++	-	-	-	-	-
<i>B. stearothermophilus</i> MHI 1457	DSM	+	-	-	-	-	-

Tabelle A4: Zusammensetzung der Stammbibliothek für Sporen von *B. cereus*, sowie deren Reaktivität mit den generierten Antikörpern

Stamm	Herkunft	Kaninchen- Antiserum (#74) ¹	mAk ²	
			1F12	2E7
<i>B. cereus</i> DSM 4312	DSM	++++	-	+
<i>B. cereus</i> DSM 4384	DSM	+++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI M1	Gewürze	++++	+++	++++
<i>B. cereus</i> MHI 10	Kindernahrung	++++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 22	Kindernahrung	++++	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 36	Kindernahrung	++++	++	++++
<i>B. cereus</i> MHI 45a	Kindernahrung	++++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 45b	Kindernahrung	++++	++	++++
<i>B. cereus</i> MHI 70	Kindernahrung	++++	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 85	Kindernahrung	++++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 100a	Kindernahrung	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 100b	Kindernahrung	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 107	Kindernahrung	++++	+	+
<i>B. cereus</i> MHI 118	Kindernahrung	++++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 140	Kindernahrung	++++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 157	Kindernahrung	+++	+	+
<i>B. cereus</i> MHI 161	DSM	+++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 162	DSM	++	+	+
<i>B. cereus</i> MHI 164	DSM	++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 166	DSM	++++	+	+
<i>B. cereus</i> MHI 167	DSM	+++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 169	DSM	+++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 180	past. Milch	++++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 183	Milchpulver	++++	+	+
<i>B. cereus</i> MHI 185	Schlagsahne	+++	+	++
<i>B. cereus</i> MHI 186	Butter	++++	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 187	Schlagsahne	+++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 188	Cream	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 189	UHT-Milchshake	+++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 194	H-Milch	++++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 200	H-Milch	++++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 252	sonstige	++++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 261	DSM	++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 264	ATCC	+++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 273	DSM	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 274	DSM	++++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 1303	DSM	++++	-	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1304	Molkenpulver	++++	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 1305/2	Reisspeise	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1306	Sahne	++++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1307	Norwegen	+++	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 1322	sonstige	+++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1329	sonstige	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1337	Nudeln	+++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1339	Surimi	+++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1347	Pudding	++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1348	Milch	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1350	Kartoffelpüree	+++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 1353	Spätzle	++++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1378	Suppe	++++	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 1382	Milch	+++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1393	sonstige	+++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1402	sonstige	++++	+	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1411	sonstige	++++	+	+++

Stamm	Herkunft	Kaninchen- Antiserum (#74) ¹	mAk ²	
			1F12	2E7
<i>B. cereus</i> MHI 1423	sonstige	++++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1429	sonstige	++++	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 1440	sonstige	++++	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 1445	sonstige	++++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 1462	ATCC	++++	+	+
<i>B. cereus</i> MHI 1471	Nudeln	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1483	sonstige	+++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1504	DSM	+++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1505	DSM	++++	-	++++
<i>B. cereus</i> MHI 1506	DSM	+++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1507	DSM	++++	-	+
<i>B. cereus</i> MHI 1524	sonstige	++++	+	+
<i>B. cereus</i> MHI 1542	sonstige	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1559	sonstige	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1575	Reisspeise	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1578	sonstige	++++	+	+
<i>B. cereus</i> MHI 1607	Geschnetzeltes	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1645	sonstige	++++	+	+
<i>B. cereus</i> MHI 1658	sonstige	++++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 1672	sonstige	++++	-	-
<i>B. cereus</i> MHI 1690	sonstige	++++	+	-
<i>B. cereus</i> MHI 1719	sonstige	+++	+	+++
<i>B. cereus</i> MHI 1727	sonstige	++++	+	-

¹ Untersuchung mittels Sandwich-EIA

² Untersuchung mittels indirektem EIA

- = keine Reaktion bei Keimzahlen von ca. $2,0 \times 10^7$ KbE/ml
- + = Reaktion bei Keimzahlen zwischen ca. $3,3 \times 10^6$ und $2,0 \times 10^7$ KbE/ml
- ++ = Reaktion bei Keimzahlen zwischen ca. $1,0 \times 10^6$ und $3,3 \times 10^6$ KbE/ml
- +++ = Reaktion bei Keimzahlen zwischen ca. $1,0 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^6$ KbE/ml
- ++++ = Reaktion bei Keimzahlen unter ca. $1,0 \times 10^5$ KbE/ml

Tabelle A5: Zusammensetzung der Stammbibliothek für Sporen der *Cereus*-Gruppe, sowie deren Reaktivität mit den generierten Antikörpern. Die Einteilung der Reaktivität und die Untersuchung in den verschiedenen EIA Systemen erfolgte nach den in Tab. A4 definierten Kriterien.

Stamm	Herkunft	Kaninchen- Antiserum (#74)	mAk	
			1F12	2E7
<i>B. mycoides</i> MHI 208	sonstige	+	-	+
<i>B. mycoides</i> MHI 1310	sonstige	+	-	+
<i>B. thuringiensis</i> MHI 257	ATCC	++++	-	-
<i>B. thuringiensis</i> MHI 271	DSM	++	-	-

Tabelle A6: Zusammensetzung der Stammbibliothek für Sporen anderer Bazillen, sowie deren Reaktivität mit den generierten Antikörpern. Die Einteilung der Reaktivität und die Untersuchung in den verschiedenen EIA Systemen erfolgte nach den in Tab. A4 definierten Kriterien.

Stamm	Herkunft	Kaninchen- Antiserum (#74)	mAk	
			1F12	2E7
<i>B. licheniformis</i> MHI 209	DSM	-	-	+
<i>B. licheniformis</i> MHI 251	sonstige	+	-	-
<i>B. subtilis</i> MHI 255	DSM	++	-	-

Tabelle A7: Zusammensetzung der Stammbibliothek für koagulasepositive Staphylokokken, sowie deren Reaktivität mit den generierten Antikörpern. Zur Bestimmung der Reaktivität wurden die Keime vor dem Einsatz in den jeweiligen Sandwich-EIA mit irrelevantem Kaninchenserum abgesättigt (3.3.5.3.1.2).

Stamm	Herkunft	Prot.-A ¹	Kaninchen- Antiserum (#71) ²	mAk ³	
				1E9	2C2
<i>S. aureus</i> MHI 300	sonstige	++++	++++	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 301	sonstige	++++	++++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 302	sonstige	++++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 303	sonstige	++++	++++	++	++
<i>S. aureus</i> MHI 304	sonstige	-	+++	-	++
<i>S. aureus</i> MHI 305	sonstige	-	+++	-	++
<i>S. aureus</i> MHI 306	sonstige	++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 307	sonstige	++++	++++	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 308	sonstige	+++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 309	sonstige	+++	++++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 310	sonstige	+++	++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 311	sonstige	++	+++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 312	sonstige	+++	++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 313	sonstige	++	+++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 314	sonstige	++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 315	sonstige	+++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 316	sonstige	+++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 317	sonstige	+++	+++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 318	sonstige	+++	+++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 319	sonstige	++	+++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 320	sonstige	+++	+++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 321	sonstige	+++	+++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 322	sonstige	+++	+++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 323	sonstige	+++	+	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 324	sonstige	+++	+++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 325	sonstige	+++	+++	++++	++
<i>S. aureus</i> MHI 326	sonstige	+++	++++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 327	sonstige	+++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 328	ATCC	++	+++	++	++
<i>S. aureus</i> MHI 329	DSM	+++	++++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 330	ATCC	-	++++	+	+++
<i>S. aureus</i> MHI 332	Forelle	+++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 333	Salzlakenkäse	-	+	-	+
<i>S. aureus</i> MHI 334	sonstige	+++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 335	Ei	+++	+++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 336	sonstige	-	++	+	++
<i>S. aureus</i> MHI 337	Kartoffelsalat	++	+	+	+
<i>S. aureus</i> MHI 338	sonstige	-	+	-	++
<i>S. aureus</i> MHI 339	sonstige	++	+	++	++
<i>S. aureus</i> MHI 340	sonstige	+++	++++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 341	sonstige	+++	+++	++++	++++
<i>S. aureus</i> MHI 342	sonstige	-	+	-	+++
<i>S. aureus</i> MHI 343	sonstige	+++	++	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 344	sonstige	-	+	-	+++
<i>S. aureus</i> MHI 345	sonstige	-	+++	+	++++
<i>S. aureus</i> MHI 346	sonstige	+	++	+	+++
<i>S. aureus</i> MHI 368	Kinderstuhl	+++	+++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 369	Molke	+	+	+	++
<i>S. aureus</i> MHI 370	Milch	+++	++++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 371	ATCC	-	+++	+	+++

Stamm	Herkunft	Prot.-A ¹	Kaninchen- Antiserum (#71) ²	mAk ³	
				1E9	2C2
<i>S. aureus</i> MHI 372	ATCC	+++	+	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 373	sonstige	+++	++	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 374	Nudeln	++	++	+	++++
<i>S. aureus</i> MHI 375	DSM	-	+++	+	+++
<i>S. aureus</i> MHI 376	sonstige	-	+++	-	+++
<i>S. aureus</i> MHI 377	ATCC	-	+	-	+++
<i>S. aureus</i> MHI 378	sonstige	+++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 379	Milch	++	+++	++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 380	sonstige	+++	+++	++++	++++
<i>S. aureus</i> MHI 381	sonstige	-	-	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 382	sonstige	+++	+	-	+
<i>S. aureus</i> MHI 383	sonstige	-	+	+	+++
<i>S. aureus</i> MHI 384	sonstige	+++	++	-	++
<i>S. aureus</i> MHI 385	Kinderstuhl	+++	++	-	++
<i>S. aureus</i> MHI 387	Katze	+++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 389	sonstige	+++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 390	sonstige	++++	++++	++++	++
<i>S. aureus</i> MHI 391	sonstige	++	+	++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 392	sonstige	+++	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 393	sonstige	+++	++	-	+
<i>S. aureus</i> MHI 395	sonstige	-	+	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 396	sonstige	+	++	+	++
<i>S. aureus</i> MHI 397	ATCC	++	+	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 398	ATCC	-	++	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 399	sonstige	++	++	++	++
<i>S. aureus</i> MHI 400	ATCC	+++	++	+++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 401	sonstige	+++	++	-	+++
<i>S. aureus</i> MHI 402	sonstige	++	++	+	+
<i>S. aureus</i> MHI 403	sonstige	+++	+++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 404	sonstige	-	++++	+	+++
<i>S. aureus</i> MHI 405	sonstige	++	++	++	++
<i>S. aureus</i> MHI 406	sonstige	++	++	+	++
<i>S. aureus</i> MHI 407	sonstige	+++	++++	+++	++
<i>S. aureus</i> MHI 408	sonstige	+++	++++	++++	+++
<i>S. aureus</i> MHI 409	Kolostrum	+++	++++	+++	+++
<i>S. aureus</i> DSM 20372	DSM	+++	++++	++++	+++
<i>S. aureus</i> DSM 20491	DSM	+	++++	++	+++
<i>S. hyicus</i> MHI 350	ATCC	-	++	-	-
<i>S. hyicus</i> MHI 351	sonstige	++	+	+	-
<i>S. hyicus</i> MHI 352	sonstige	+	+	-	-
<i>S. hyicus</i> MHI 353	sonstige	-	+	-	-
<i>S. hyicus</i> MHI 354	sonstige	-	+	-	-
<i>S. hyicus</i> MHI 355	sonstige	-	+	-	-
<i>S. intermedius</i> MHI 349	DSM	-	+++	-	-

¹ Untersuchung auf Protein-A siehe 3.3.5.3.1.2, die Einteilung folgt hier den KbE/ml von ²

- = keine Reaktion bei Keimzahlen von ca. $2,0 \times 10^7$ KbE/ml
- + = Reaktion bei Keimzahlen zwischen ca. $6,7 \times 10^6$ und $2,0 \times 10^7$ KbE/ml
- ++ = Reaktion bei Keimzahlen zwischen ca. $1,0 \times 10^6$ (³) bzw. $2,0 \times 10^6$ (²) und $6,7 \times 10^6$ KbE/ml
- +++ = Reaktion bei Keimzahlen zwischen ca. $2,0 \times 10^5$ (³) bzw. $6,7 \times 10^5$ (²) und $1,0 \times 10^6$ (³) bzw. $2,0 \times 10^6$ (²) KbE/ml
- ++++ = Reaktion bei Keimzahlen unter ca. $2,0 \times 10^5$ (³) bzw. $6,7 \times 10^5$ (²) KbE/ml

Tabelle A8: Zusammensetzung der Stammbibliothek für koagulasenegative Staphylokokken, sowie deren Reaktivität mit den generierten Antikörpern. Zur Bestimmung der Reaktivität wurden die Keime vor dem Einsatz in den jeweiligen Sandwich-EIA mit irrelevantem Kaninchenserum abgesättigt (3.3.5.3.1.2). Die Einteilung der Reaktivität erfolgte nach den in Tab. A7 definierten Kriterien.

Stamm	Herkunft	Prot.-A	Kaninchen- Antiserum (#71)	mAk	
				1E9	2C2
<i>S. calnii</i> MHI 357	DSM	-	+++	-	-
<i>S. epidermidis</i> MHI 356	ATCC	-	++++	-	-
<i>S. haemolyticus</i> MHI 411	Kolostrum	-	++	-	-
<i>S. hominis</i> MHI 364	ATCC	-	++	-	-
<i>S. hyicus-chromogenes</i> MHI 359	sonstige	-	++++	-	-
<i>S. Problemstamm</i> * MHI 365	sonstige	-	+	-	++
<i>S. Problemstamm</i> * MHI 366	sonstige	++	++	+	++
<i>S. Problemstamm</i> * MHI 367	sonstige	+	+	-	++
<i>S. saprophyticus</i> MHI 363	Corn Cob Mix	-	+	-	-
<i>S. sciuri</i> MHI 361	ATCC	-	-	-	-
<i>S. sciuri</i> MHI 410	Kolostrum	-	++	-	-
<i>S. simulans</i> MHI 358	ATCC	-	++++	+	-
<i>S. staphylolyticus</i> MHI 347	sonstige	-	+	-	-
<i>S. warneri</i> MHI 360	ATCC	-	-	-	-
<i>S. warneri</i> MHI 412	Kolostrum	-	+++	-	-
<i>S. xylosus</i> MHI 362	DSM	-	+	-	-
<i>S. xylosus</i> MHI 413	Kolostrum	-	-	-	-

* Aufgrund unklarer Befunde in den biochemischen und mikrobiologischen Differenzierungstests sind diese Stämme nicht eindeutig einer bestimmten Staphylokokken-Spezies zuzuordnen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um *S. aureus* Stämme.

8 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Erwin Märtlbauer für die Überlassung des Themas und die Erlaubnis, eine eigene Wahlpflichtvorlesung zu halten. Beides gab mir Gelegenheit, fachlich und menschlich zu wachsen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Richard Dietrich für die Betreuung der Dissertation und das Teilen seines enormen Erfahrungs- und Wissensschatzes bedanken.

Für die stets hervorragende und freundliche Unterstützung möchte ich mich bei Frau Gabriele Açar, Herrn Dr. Heinz Becker, Frau Dr. Andrea Didier, Herrn Mostefa Djeflal, Frau Susanne Eberhardt, Frau Martina Kramler, Frau Marion Lorber, Frau Josefine März, Frau Brunhilde Minich, Herrn Dr. Maximilian Moravek, Frau Kriaki Moysiadou, Frau Dr. Carina Nielsen, Frau Elissavet Panidou, Frau Ute Ritzerfeld, Frau Maja Rother, Frau Kalliopi Spanoudaki, Frau Stephanie Straßner, Frau Angela Szavits, Herrn Monito Tierno, Frau Ursula Tobisch, Frau Angelika Welter und Frau Franziska Witzko bedanken.

Meinen Kollegen und Kolleginnen als Doktoranden und Doktorandinnen am Lehrstuhl möchte ich ganz herzlich für das gute Arbeitsklima und die gegenseitige Unterstützung danken.

Weiter danke ich den Kollegen und Kolleginnen der anderen an diesem Forschungsprojekt beteiligten Institute, insbesondere Frau Madeleine Groß aus Gießen, Herrn Jan-Hinnerk Jarck aus Hamburg und Frau Sonja Ott aus München.

Meinen Freunden danke ich für die moralische Unterstützung und Rat und Tat in all den Momenten, in denen ich sie benötigt habe.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, ohne die mir dieser Weg nie offen gestanden hätte, und die mich in jeder Lebenslage rückhaltlos unterstützen.